

**Klonierung und Charakterisierung
neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktoren
für die GTPase Rho**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereiches
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität GH Essen

vorgelegt von
Andrea Freichel-Blomquist

aus Saarbrücken

Mai 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Jakobs

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: Prof. Dr. W. U. Müller

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. B. Feige

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2001

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. K. H. Jakobs für die freundliche Überlassung des Themas, die Unterstützung bei meiner Arbeit während meiner Zeit im Institut für Pharmakologie und die Möglichkeit zum Besuch von Kongressen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Rümenapp für die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Frau Simone Olesch, Frau Barbara Langer und Frau Claudia Moorkamp danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Arbeiten in der Zellkultur.

Außerhalb des Institutes gilt mein Dank Dr. Dieter Brockmann (Institut für Molekularbiologie, Tumorforschung, Uniklinik Essen) für die Bereitstellung der humanen cDNA-Bibliothek aus fetalem Gehirn und Dr. T. Nagase (Kazusa-DNA-Forschungsinstitut, Chiba, Japan) für die cDNA von p114-Rho-GEF und KIAA0337. Die verwendeten aufgereinigten Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 wurden uns freundlicherweise von Prof. A. Wittinghofer (Max-Planck-Institut, Dortmund) zur Verfügung gestellt.

Für die gute Zusammenarbeit während ihrer Zeit im Labor möchte ich mich bei Herrn Guntram Schwörer, Herrn Helge Schablowski, Frau Amalia Psoma, Frau Michaela Lehen und Herrn Burkhard Wittinghofer bedanken.

Die vorgelegten Studien wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS I

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN 1

1. EINLEITUNG 4

1.1	Signaltransduktion und Rezeptoren.....	4
1.2	Struktur und Funktion heterotrimerer G-Proteine	5
1.3	Monomere GTP-bindende Proteine.....	6
1.4	Physiologische Bedeutung von GTPasen der Rho-Familie.....	7
1.5	Mechanismen der Aktivierung von RhoA.....	12
1.6	Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho-GTPasen.....	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit	21

2. MATERIAL UND METHODEN..... 23

2.1	Materialien.....	23
2.1.1	Chemikalien.....	23
2.1.2	Radioaktive Substanzen	26
2.1.3	Antikörper	26
2.1.4	Enzyme	26
2.1.5	Plasmide	27
2.1.6	Sonstige Verbrauchsmaterialien	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Synthese von Erststrang-cDNA.....	32
2.2.3	DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.2.4	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	35
2.2.5	Untersuchung von cDNA-Bibliotheken	35
2.2.6	Isolierung von DNA	39
2.2.7	Northern Blot-Analyse	41
2.2.8	Autoradiographie.....	41
2.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	42

2.2.10	Transiente Transfektion von HEK293- und J82-Zellen	45
2.2.11	Untersuchung des Aktin-Cytoskeletts von J82-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.2.12	Proteinbestimmung.....	47
2.2.13	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
2.2.14	Westernblot-Analyse	48
2.2.15	Proteingewinnung aus Sf9-Insektenzellen.....	49
2.2.16	Gewinnung von rekombinantem RhoA, Rac1 und Cdc42 aus <i>Escherichia coli</i>	52
2.2.17	Messung des Guaninnukleotid-Austauschs von Rho-GTPasen	53
2.2.18	Untersuchung der Interaktion von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren mit Rho-GTPasen bzw. von N- und C-Terminus von KIAA0337	54
2.2.19	Untersuchung der "Serum response factor"-abhängigen Aktivierung der Gentranskription	56
<u>3.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	58
3.1	Charakterisierung von p114-Rho-GEF, ein neuer Guaninnukleotid- Austauschfaktor für die GTPase RhoA	58
3.2	Klonierung und Charakterisierung eines bislang unbekannten Proteins mit Homologien zu den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho-GTPasen.....	85
3.3	Charakterisierung eines neuen Guaninnukleotid-Austauschfaktors der Dbl-Familie mit deutlich abweichender Struktur	115
<u>4.</u>	<u>DISKUSSION</u>	131
<u>5.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	149
<u>6.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	151
<u>7.</u>	<u>ANHANG</u>	171

Verwendete Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APP-PNP	Adenosin-5'-[β,γ -imino]-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ("Bovine serum albumin")
cDNA	Komplementäre DNA ("Copy DNA")
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bequerel)
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
cpm	Zählereignisse pro Minute ("Counts per minute")
Da	Dalton
DH	"Dbl homology"
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECL	"Enhanced chemiluminescence"
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	(1,2-Bis-Ethylenglykol-bisaminoethoxyethan)-

	N,N,N',N'-tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL	"full length"
G-Protein	Heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Austauschinhibitor
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-[γ -thio]-triphosphat
G418	Genitacin
h	Stunde(n)
HEK293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen ("Human embryonic kidney cells")
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J82-Zellen	Humane Harnblasenkarzinomzellen
LB-Agar/-Medium	Luria Bertani-Agar/-Medium
LPA	Lysophosphatidsäure
mAChR	Muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MEM	"Minimal essential medium"
min	Minute(n)
MMLV	"Moloney murine leukemia virus"
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
(m/v)	Masse pro Volumen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	"Platelet-derived growth factor"
PH	"Pleckstrin homology"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGS	"Regulator of G protein signalling"
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAsin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat ("Sodium dodecyl sulfate")
Sf9-Zellen	Insektenzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SRE	"Serum response element"
SRF	"Serum response factor"
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
Triton X-100	Polyethylenglycol-p-isooctylphenylether
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Einheit(en)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	"Visible"
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Signaltransduktion und Rezeptoren

Die einzelnen Zellen eines vielzelligen Organismus erhalten aus ihrer Umwelt Informationen verschiedenster Art in Form von Konzentrationsänderungen extrazellulärer, chemischer Signalmoleküle oder durch physikalische Signale. Da die Zellen von einer semipermeablen Membran umgeben sind, können Ionen und größere Moleküle diese jedoch nicht ungehindert in das Zellinnere passieren. Neben spezifischen, aktiven und passiven Transportsystemen durch die Membran besitzen die Zellen für den jeweiligen Zelltyp spezifische, membrangebundene Rezeptoren, um die unterschiedlichen Signalmoleküle auf der Zelloberfläche wahrzunehmen und das Signal in das Zellinnere weiterzuleiten. Dabei kommt es durch Interaktion eines passenden hydrophilen Liganden oder eines physikalischen Reizes mit dem Rezeptorsystem zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins und damit zur Auslösung einer Kaskade von Reaktionen innerhalb der Zelle. Im Gegensatz zu diesen Membranrezeptoren sind die Rezeptoren der lipophilen Signalstoffe (z.B. der Steroidhormone) intrazellulär lokalisiert. Hinsichtlich der Struktur des membrangebundenen Rezeptorproteins und der ausgelösten Signalübertragung unterscheidet man einerseits Systeme aus einer einzigen strukturellen Einheit, wie Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität (z.B. der Insulin-Rezeptor) oder mit Rezeptoren assoziierte Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (z.B. der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor) und andererseits Systeme aus drei separaten Komponenten, welche die größte Gruppe der Membranrezeptoren darstellen. Dabei koppeln heptahelikale Rezeptoren über ein heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) an einen Effektor. Bislang sind mehr als 100 dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt und charakterisiert, zu denen beispielweise Rezeptoren für Neurotransmitter (muskarinische Acetylcholinrezeptoren, adrenerge Rezeptoren), biogene Amine, Peptid- und Glykoproteinhormone aber auch Rezeptoren für Licht und Geruchsstoffe gehören. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten für die meisten Liganden verschiedene Rezeptorsubtypen identifiziert werden, welche pharmakologisch unterschieden werden können (Dohlgan *et al.*, 1991; Coughlin, 1994; Baldwin, 1994; Watson & Arkinstall, 1994; Birnbaumer & Birnbaumer, 1995). Die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte

Rezeptoren ist bei vielen physiologischen und pharmakologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung.

1.2 Struktur und Funktion heterotrimerer G-Proteine

Durch Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kommt es zur Aktivierung von G-Proteinen (Hepler & Gilman, 1992; Spiegel *et al.*, 1992; Clapham & Neer, 1993). Diese G-Proteine sind heterotrimer und bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Die β - und γ -Untereinheiten bilden unter nicht-denaturierenden Bedingungen ein stabiles Dimer und damit eine funktionelle Einheit. Die Aktivierung der G-Proteine führt zur Freisetzung von gebundenem GDP aus der α -Untereinheit des inaktiven Heterotrimers und dessen Ersatz durch GTP, das in größeren Konzentrationen als GDP in den Zellen vorkommt (Birnbaumer *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1991; Birnbaumer, 1992). Infolge dieses GDP/GTP-Austausches dissoziiert das G-Protein nach Konformationsänderung vom Rezeptor und das Trimer zerfällt in die GTP-tragende, monomere α -Untereinheit und das freie $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer ist in der Lage, unabhängig voneinander an spezifische Effektorsysteme (Enzyme oder Ionenkanäle) zu binden und deren Aktivität zu steuern (Clapham & Neer, 1993). Dabei kann ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor verschiedene G-Proteine aktivieren, und ein G-Protein wiederum kann mehrere unterschiedliche Effektoren aktivieren und somit verschiedene Signalwege regulieren (Ross, 1992). Da ein Membranrezeptor zudem in der Lage ist, mehrere gleiche G-Proteine hintereinander zu aktivieren, welche dann über die Effektorsysteme viele Moleküle "Second messenger" erzeugen, kommt es gleichzeitig zu einer Verstärkung des Signals (Chabre & Deterre, 1989). Bei der Abschaltung des Systems wird das an die α -Untereinheit gebundene GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert, bevor die α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Dimer zum heterotrimeren Ausgangszustand reassoziert und das inaktive G-Protein u.U. wieder an den Rezeptor bindet (Watson & Arkininstall, 1994; Birnbaumer & Birnbaumer, 1995).

Zur Zeit sind 20 verschiedene α -Untereinheiten mit einer molekularen Masse zwischen 39 und 52 kDa bekannt, die basierend auf dem Grad ihrer Sequenzhomologien und

ihrer Funktionen in vier Familien unterteilt werden, nämlich $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.*, 1991). Des weiteren sind bis jetzt 5 verschiedene β -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 36 kDa (Watson *et al.*, 1994, 1996) und 12 γ -Untereinheiten mit einem molekularen Gewicht zwischen 6 und 9 kDa (Ray *et al.*, 1995; Morishita *et al.*, 1995) beschrieben worden. Während die β -Untereinheiten untereinander große Homologien aufweisen, besitzen die γ -Untereinheiten nur geringe Ähnlichkeiten und bestimmen wahrscheinlich die funktionelle Spezifität des $G\beta\gamma$ -Komplexes. Viele der Untereinheiten kommen ubiquitär vor, andere zeigen ein räumlich und/oder zeitlich verschiedenes Expressionsmuster. Die α - und γ -Untereinheiten werden auf vielfältige Weise kotranslational und posttranslational durch Acylierung oder Isoprenylierung modifiziert. Diese Lipid-Modifikationen beeinflussen die Interaktionen zwischen den Untereinheiten sowie zwischen der jeweiligen Untereinheit und der Plasmamembran (Spiegel *et al.*, 1991; Yamane & Fung, 1993; Casey, 1994).

1.3 Monomere GTP-bindende Proteine

Die kleinen oder monomeren GTP-bindenden Proteine stellen, ähnlich wie die heterotrimeren G-Proteine, molekulare Schalter dar. Sie sind an der Regulation einer Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen Prozessen, wie Mitogenese, Proteinsekretion, intrazellulärer vesikulärer Transport und Organisation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt (Bourne *et al.*, 1991; Zerial & Huber, 1995). Untersuchungen der Struktur dieser kleinen GTP-bindenden Proteine ergaben, daß sie jeweils aus einer einzelnen Polypeptid-Kette von etwa 200 Aminosäuren mit einer relativen molekularen Masse von 18-28 kDa bestehen. Auch ihr Aktivitätszustand wird, wie der heterotrimerer G-Proteine, über einen GTPase-Zyklus reguliert, weshalb sie auch als kleine GTPasen bezeichnet werden. Im GDP-gebundenen Zustand sind sie inaktiv, dagegen vermitteln sie im aktiven GTP-gebundenen Zustand Signale an ihre Effektoren. Dieser Übergang zwischen dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und dem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wird durch verschiedene positive und negative Regulatoren kontrolliert, die direkt und spezifisch mit den kleinen GTP-bindenden Proteinen interagieren (Boguski & McCormick, 1993). Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs)

katalysieren als positive Regulatoren die Freisetzung von GDP, erleichtern die Bindung von GTP und aktivieren somit die kleinen GTP-gebundenen Proteine. Die Interaktion der aktiven GTP-gebundenen Form mit den Effektoren wird durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP beendet. Da die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen GTP-bindenden Proteine meist sehr gering ist, existieren negative Regulatoren, GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), welche die intrinsische Aktivität der GTP-Hydrolyse und damit die Bildung des inaktiven, GDP-gebundenen Zustands beschleunigen. Zumindest für einige der kleinen GTP-bindenden Proteine wurden zudem Guaninnukleotid-Austauschinhibitoren (GDIs) beschrieben, die den Nukleotidaustausch behindern. Daneben haben GDI-Proteine offenbar die Funktion, die meist posttranslational modifizierten GTPasen im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand im Cytosol zu stabilisieren.

Bisher sind ungefähr 60 verschiedene kleine GTP-bindende Proteine beschrieben worden, die eine Superfamilie bilden und aufgrund ihrer Sequenzhomologien und ihrer spezifischen Funktionen in fünf verschiedene Subfamilien eingeteilt werden: Ras, Ran, Rab, ARF und Rho. Die einzelnen Familien zeigen eine ca. 30%ige Identität in ihrer Aminosäuresequenz, während innerhalb der Familien eine Sequenzidentität von mindestens 50 % besteht. Proteine der Ras-Familie sind an der Kontrolle des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt (Hall, 1994), Ran-Proteine werden für die Steuerung des Transportes von Proteinen in den Zellkern benötigt (Goldfarb, 1994). Die Mitglieder der Rab- und ARF-Familie der kleinen GTPasen regulieren den intrazellulären Transport von Vesikeln zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten (Donaldson & Klausner, 1994; Chavrier & Goud, 1999).

1.4 Physiologische Bedeutung von GTPasen der Rho-Familie

Die Rho-Familie bildet eine Untergruppe der Ras-Superfamilie der monomeren GTP-bindenden Proteine. Viele dieser Proteine werden ubiquitär exprimiert und ihre Sequenzen sind in allen eukaryonten Organismen, von Hefen über Pflanzen bis hin zu den Säugetieren, weitestgehend konserviert. Die Rho-GTPasen der Säugetiere werden in sechs verschiedene Gruppen mit den Mitgliedern Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG),

Cdc42 (Cdc42Hs, G25K, TC10), Rnd (RhoE/Rnd3, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7), RhoD und TTF eingeteilt (Kjøller & Hall, 1999). Besonders gut untersucht sind die Proteine der Rho-, Rac- und Cdc42-Subgruppe. Während ursprünglich angenommen wurde, daß Rho-Proteine spezifisch in die Regulation des Aktin-Cytoskeletts eingeschaltet sind (Paterson *et al.*, 1990), konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß diese GTPasen als essentielle Regulatoren zudem an vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt sind, die durch verschiedene extrazelluläre Signale und Rezeptortypen aktiviert werden (Mackay & Hall, 1998; Kjøller & Hall, 1999; Seasholtz *et al.*, 1999).

Bei der Identifizierung der über Rho-GTPasen vermittelten Signaltransduktionswege spielte die Möglichkeit, einzelne GTPasen spezifisch aktivieren und blockieren zu können, eine wichtige Rolle. Hierzu wurden konstitutiv aktive Mutanten ohne intrinsische GTPase-Aktivität und dominant negative Mutanten mit verminderter Affinität für GTP als Abfänger der den GTP/GTP-Austausch katalysierenden (Rho-)GEFs verwendet. Als Alternative zu den dominant negativen Proteinen wurden des weiteren verschiedene bakterielle Toxine eingesetzt, welche in der Lage sind, die kleinen GTPasen spezifisch zu inaktivieren. Zu diesen Toxinen zählen die C3-Transferase aus *Clostridium (Cl.) botulinum*, welche spezifisch Rho(A-C) ADP-ribosyliert und dadurch inaktiviert, das Cytotoxin B von *Cl. difficile*, das Rho, Rac und Cdc42 glucosyliert und inaktiviert, und das für die Inaktivierung von Rac, Ras, Ral und Rap spezifische Letale Toxin aus *Cl. sordellii* (Aktories *et al.*, 1992, Just *et al.*, 1994, 1995 und 1996; Popoff *et al.*, 1996).

Erste Hinweise auf eine Rolle von Rho-Proteinen bei der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts wurden mittels C3-Transferase erhalten (Chardin *et al.*, 1989). Untersuchungen in Swiss 3T3-Fibroblasten zeigten, daß die Mikroinjektion von aktiviertem RhoA sowie die Stimulation der Zellen mit Lysophosphatidsäure (LPA) über die Aktivierung von Rho zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern und zur Zusammenlagerung von Integrinen und assoziierten Proteinen zu "focal adhesion"-Komplexen führen (Ridley & Hall, 1992). Dagegen induziert Rac, welches durch PDGF oder Insulin aktiviert werden kann, durch Aktin-Polymerisation in der Zellperipherie die Bildung von Lamellipodien und sog. "membrane ruffles" (Ridley *et al.*, 1992), und die Aktivierung von Cdc42 durch Bradykinin führt zur Ausbildung von fingerförmigen Fortsätzen, den sog. Filopodien oder "microspikes" (Kozma *et al.*, 1995). Somit scheinen Rho, Rac und Cdc42 bei verschiedenen zellulären Prozessen, die

alle mit einer Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts einhergehen, wie Zellmigration, Adhäsion und Änderung der Zellmorphologie, beteiligt zu sein (Paterson *et al.*, 1989; Miura *et al.*, 1993; Takaishi *et al.*, 1993 und 1994; Laudanna *et al.*, 1996; Zigmond, 1996; Hall, 1998).

Wie die GTPasen im einzelnen auf das Aktin-Cytoskelett wirken, ist bisher nur in Ansätzen verstanden, wobei wahrscheinlich mehrere verschiedene Angriffspunkte von Bedeutung sind. Ein regulatorisches Prinzip der Rho-Proteine verläuft offenbar über Serin/Threoninkinasen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Rho-Kinase (Leung *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996), die spezifisch durch Rho, nicht jedoch durch Rac1 oder Cdc42 aktiviert wird und dann eine regulatorische Untereinheit (MBS) der Myosin-Phosphatase phosphoryliert (Kimura *et al.*, 1996). Hieraus und aus dem direkten Angriff der Rho-Kinase an Myosin (Amano *et al.*, 1996) resultiert eine verstärkte Aktin-Myosin-Interaktion, welche für die Bildung der Aktin-Streßfasern und der "focal adhesion"-Komplexe essentiell ist (Chrzanowska-Wodnicka & Burridge, 1996). Auch der Rho-Effektor p140 mDia scheint an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt zu sein (Watanabe *et al.*, 1997). Ein weiterer Signalweg, der zur Aktinpolymerisation führen könnte, verläuft über Phospholipide. Rho und Rac, nicht jedoch Cdc42, stimulieren die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase und somit die Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂], welches an der Regulation einer Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen beteiligt ist (Chong *et al.*, 1994; Tolia *et al.*, 1995; Hartwig *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1996; Zigmond, 1996; Zigmond *et al.* 1997). Die zellulären Prozesse, die über Rac und Cdc42 zu einer Aktin-Polymerisation führen sind ebenfalls noch weitgehend unklar. Ob Rac und Cdc42 durch Aktivierung der p65 PAK-Kinase, die mit den Aktinfilamenten kolokalisiert ist, die Polymerisation der Aktinfilamente regulieren, wird kontrovers diskutiert (Joneson *et al.*, 1996; Lamarche *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1996). Eine funktionelle Verbindung von Cdc42 zum Aktin-Cytoskelett könnte über eine Interaktion mit dem WASP-Protein erfolgen (Symons *et al.*, 1996). Auch der LIM-Kinase (LIMK) wurde eine Rolle bei der durch Rho-Proteine induzierten Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts zugeschrieben. Es scheinen zumindest zwei Signaltransduktionswege zu existieren, die über die Phosphorylierung von Cofilin zur Bildung von Lamellipodien bzw. von Aktin-Streßfasern und Filopodien führen, nämlich Rac-LIMK1-Cofilin und Rho/Cdc42-LIMK2-Cofilin (Mizuno *et al.*, 1994; Nunoue *et*

al., 1995; Okano *et al.*, 1995; Sumi *et al.*, 1999). Neuere Befunde sprechen zudem für eine Aktivierung der LIMK2 durch den Rho nachgeschalteten Effektor Rho-Kinase ROCK und für eine Aktivierung der LIMK1 durch den Rac-Effektor PAK1 (Sumi *et al.*, 2001).

Neben der Regulation des Aktin-Cytoskeletts wurde die Beteiligung von Rho-GTPasen an der Stimulation der Gentranskription beschrieben. Während Ras die Aktivierung des p42/44 MAP-Kinase-Signalweges kontrolliert, aktivieren sowohl Rac als auch Cdc42 den "c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase" (JNK)- und den "p38 mitogen-activated protein kinase" (p38)-Signalweg (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995). Im Gegensatz zur p42/44 MAPK werden die JNKs und die p38-Kinase nicht durch Mitogene, sondern hauptsächlich durch verschiedene Arten von zellulärem Streß oder durch inflammatorische Stimuli aktiviert, woraufhin sie in den Zellkern translozieren und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Treisman, 1996). Dies läßt vermuten, daß zelluläre Prozesse, bei denen die Aktivierung der JNK eine Rolle spielt, wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose, über Rho-GTPase-vermittelte Signaltransduktionswege gesteuert werden. Des weiteren vermögen Rho, Rac und Cdc42 die Aktivität des "serum response factor" (SRF) zu stimulieren (Hill *et al.*, 1995). SRF bildet mit dem durch den Ras-Raf-ERK-Signalweg aktivierten "ternary complex factor" (TCF) einen Komplex, welcher die Transkription von Genen stimuliert, die in ihrer Promotor-Regulatorsequenz ein "serum response element" (SRE) tragen, wie z.B. der *c-fos* Promotor (Treisman, 1990 und 1994). Serum, LPA und der Aktivator heterotrimerer G-Proteine AlF_4^- waren in der Lage, *c-fos* SRE zu aktivieren, wobei diese Aktivierung abhängig von SRF war, jedoch unabhängig von der Bildung eines Komplexes mit TCF (Hill & Treisman, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Rho für die SRF-vermittelte Aktivierung der Gentranskription durch LPA, Serum oder AlF_4^- notwendig ist. Die Aktivierung von SRF durch Rac und Cdc42 ist jedoch unabhängig von Rho, was auf die Existenz zumindest zweier durch Rho-GTPasen kontrollierter Signalwege schließen läßt, die zur Aktivierung von SRF führen, wobei die hieran beteiligten Mechanismen jedoch noch wenig verstanden sind (Hill *et al.*, 1995). Hierbei scheinen Serin/Threoninkinasen als Effektoren von Rho eine Rolle zu spielen, wie die Rho-Kinase (Leung *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996) und die zur Proteinkinase C homologen Kinasen PKN/PRK1 und PRK2 (Amano *et al.*, 1996; Quilliam *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Vincent & Settleman, 1997). Die Expression

konstitutiv aktiver Mutanten der Rho-Kinase und der PRK2 stimulierte die Transkriptionsaktivität des *c-fos* SRE (Quilliam *et al.*, 1996; Chihara *et al.*, 1997). Allerdings fanden Sahai *et al.* (1998), daß die Stimulation von SRF durch aktiviertes RhoA unabhängig von den untersuchten Effektor-Kinasen Rho-Kinase oder PKN erfolgte. Die beiden spezifischen Isoformen PKC- α und PKC- ϵ scheinen dagegen in den Signalweg der über Rho(A) vermittelten Aktivierung des SRF eingeschaltet zu sein (Soh *et al.*, 1999). Auch die LIM-Kinase-1 konnte kürzlich als potenter Aktivator von SRF identifiziert werden, obwohl die Stimulation von SRF nicht direkt von der LIMK abhängig war (Sotiropoulos *et al.*, 1999). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß Rho, Rac und Cdc42 an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und dessen Translokation in den Zellkern beteiligt sind (Sulciner *et al.*, 1996; Montaner *et al.*, 1997; Perona *et al.*, 1997), wobei auch hier der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Vermutlich spielt die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies durch Rac bei der Aktivierung von NF κ B eine Rolle, wobei vielleicht ein interessanter Zusammenhang mit der Tatsache besteht, daß Rac einen wichtigen Aktivator der NADPH-Oxidase in Phagocyten darstellt (Ridley, 1995).

Rho-GTPasen fungieren auch als essentielle Regulatoren der Zellproliferation, indem sie die Progression von Zellen aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus stimulieren. Ob hierbei Effekte auf das Aktin-Cytoskelett oder direkte Effekte auf die Gentranskription von Bedeutung sind, wurde bisher noch nicht weiter untersucht (Yamamoto *et al.*, 1993; Imamura & Narumiya, 1993; Olson *et al.*, 1995; Lamarche *et al.*, 1996; Joneson *et al.*, 1996). Eine potentielle Rolle von Rho-GTPasen beim Zellwachstum legen die Befunde nahe, daß viele GEFs für Rho, Rac und Cdc42 Onkogene sind (Michiels *et al.*, 1995; Cerione & Zheng, 1996) und Rho-GTPasen in einigen Zelllinien selbst ein transformierendes Potential zeigten (Khosravi-Far *et al.*, 1995). Rho scheint zudem eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Fibroblasten durch Serum-Entzug zu spielen (Jiménez *et al.*, 1995). Weitere Untersuchungen zeigten, daß Rho-Proteine am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind (Lamaze *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1996).

Schließlich wird die Funktion einiger am Phospholipid-Metabolismus beteiligter Enzyme durch Rho-Proteine moduliert. Für verschiedene Zellsysteme konnte gezeigt werden, daß Rho(A) und ARF zusammen mit der Proteinkinase C (PKC) und dem Phospholipid PtdIns(4,5)P₂ an der Regulation der Phospholipase D beteiligt sind (Brown *et al.*, 1993;

Bowman *et al.*, 1993; Malcolm *et al.*, 1994; Rümenapp *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996a und b; Rümenapp *et al.*, 1997; Rümenapp *et al.*, 1998a). Des weiteren werden, wie oben bereits erwähnt, die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase sowie die Phosphoinositid-3-Kinase durch Rho reguliert (Chong *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993). Weitere Effektoren von Rho, die aufgrund ihrer Fähigkeit, mit aktivierten Formen von Rho zu interagieren, gefunden wurden, sind die Proteine Rhophilin, Rhotekin und Citron, die alle ein Rho-Bindungsmotiv beinhalten (Madaule *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1996).

1.5 Mechanismen der Aktivierung von RhoA

Obwohl, wie oben beschrieben, viele Effektoren von Rho-Proteinen isoliert werden konnten, sind deren physiologische Funktionen und nachgeschaltete Zielproteine ebenso wie die Signalwege, die von membranständigen Rezeptoren zur Aktivierung der Rho-GTPasen führen, noch wenig verstanden. Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, daß die Rho-GTPasen sequentiell in Signalkaskaden verschaltet sein können. Die Mikroinjektion von aktiviertem Ras in Swiss 3T3-Zellen stimulierte sowohl die Rac-abhängige Ausbildung von Lamellipodien als auch die Rho-abhängige Bildung von Streßfasern und "focal adhesion"-Komplexen (Ridley & Hall, 1992). In Studien zur Organisation des Aktin-Cytoskeletts in Swiss 3T3-Zellen stimulierte Cdc42 die Aktivität von Rac, welches wiederum Rho aktivierte (Nobes & Hall, 1995). Für Rac, Rho, und schließlich auch für Cdc42, konnte in einigen Zelllinien ein transformierendes und onkogenes Potential nachgewiesen werden. Während die Expression von konstitutiv aktivem Rac ausreichte, um in Fibroblasten der Ratte eine Transformation hervorzurufen, war dies bei Rho nicht der Fall. Jedoch scheinen in dieser Zelllinie Rac, Rho und Cdc42 für die Transformation durch onkogenes Ras notwendig zu sein, was auch hier darauf schließen läßt, daß diese Rho-GTPasen in einer Signalkaskade Ras nachgeschaltet sind (Qiu *et al.*, 1995a und b).

Besonders intensiv wurden die molekularen Mechanismen der Aktivierung von Rho-Proteinen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Hinblick auf die beteiligten G-Proteine und ihre Untereinheiten untersucht. LPA wurde als erster Rezeptor-Agonist identifiziert, der eine Aktivierung von Rho bewirkt (Ridley & Hall, 1992). In den letzten Jahren wurden

weitere Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beschrieben, die Rho in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp aktivieren, u.a. Spingosin-1-phosphat, Bombesin, Thrombin, Endothelin, Carbachol oder Angiotensin II (Seasholtz *et al.*, 1999). Da Rho-Proteine vermutlich aufgrund der Wechselwirkung mit einem Rho-GDI im inaktiven Zustand hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind und bei ihrer Aktivierung vom GDI dissoziieren und an Zellmembranen translozieren, wurde in diesen Studien die relative zelluläre Verteilung von Rho untersucht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Stimulation von permeabilisierten HEK 293-Zellen mit dem hydrolysestabilen GTP-Analogon Guanosin-5'-[γ -thio]-triphosphat zu einer Abnahme von Rho im Cytosol führte, die durch Vorbehandlung der Zellen mit Carbachol vermittelt über den in diesen Zellen stabil exprimierten M₃ mAChR rekonstituiert werden konnte (Keller *et al.*, 1997). Die nach der Aktivierung des LPA-Rezeptors beobachtete Cytosol-Membran-Translokation von Rho in Swiss 3T3-Fibroblasten wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt, was die Beteiligung von Mitgliedern der Familien G_i und G_o heterotrimerer G-Proteine nahelegte (Fleming *et al.*, 1996). Dagegen waren die meisten der durch Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren induzierten, Rho-vermittelten Effekte auf das Aktin-Cytoskelett PTX-insensitiv (Jalink *et al.*, 1993; Ridley & Hall, 1994; Tigyi *et al.*, 1996; Majumdar *et al.*, 1998). So wurde in Swiss 3T3-Fibroblasten die von RhoA abhängige Bildung von Aktin-Streßfasern und "focal adhesion"-Komplexen nach Expression von GTPase-defizientem G α_{12} und G α_{13} beobachtet, nicht jedoch nach Expression von konstitutiv aktivem G α_{i2} oder G α_q (Buhl *et al.*, 1995). Jedoch wurde in dieser Zelllinie die durch LPA induzierte Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts nur durch Mikroinjektion von Antikörpern gegen G α_{13} blockiert, was darauf hindeutet, daß G α_{13} , nicht aber G α_{12} , an dieser durch LPA induzierten Aktivierung von Rho beteiligt ist (Gohla *et al.* 1998). Zumindest in Swiss 3T3-Fibroblasten scheint bei der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts weder eine Erhöhung des intrazellulären Calciums noch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) oder cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) als sekundärer Botenstoff von Bedeutung zu sein (Ridley & Hall, 1994). Vielmehr sind offenbar Tyrosinkinasen in die Signalkaskade des G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptors zur Aktivierung von RhoA und Ausbildung von Aktin-Streßfasern eingeschaltet, wie mit Hilfe von Tyrosinkinase-Inhibitoren gezeigt werden konnte. In Einklang mit dieser Vorstellung ließ sich die Bildung von Aktin-Streßfasern durch Zugabe

des Tyrosinphosphatase-Hemmstoffs Pervanadat in vielen Zellsystemen nachahmen (Ridley & Hall, 1994; Nobes *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 1998 und 1999; Rümenapp *et al.*, 1998b). Des weiteren induzierte konstitutiv aktive Phosphoinositid-3-Kinase die Rac-abhängige Bildung von Lamellipodien und die Rho-anhängige Bildung von Aktin-Streßfasern (Reif *et al.*, 1996).

Aktiviertes $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ waren in der Lage, Rho-abhängig die über SRF vermittelte Gentranskription zu stimulieren (Mao *et al.*, 1998a). Des weiteren konnte in NIH 3T3-Zellen gezeigt werden, daß die über RhoA vermittelte Aktivierung des "serum response element" nach Stimulation des M_1 mAChR über die G-Protein-Untereinheit $G\alpha_{12}$ verläuft (Fromm *et al.*, 1997). Eine direkte Verbindung in der Signalkaskade zwischen G-Protein- α -Untereinheiten und Rho scheint über ein GEF vermittelt zu werden. Verschiedenen Studien zeigten, daß der Rho-spezifische Austauschfaktor p115 RhoGEF eine "regulator of G protein signalling" (RGS)-Domäne mit GTPase-aktivierender Aktivität für die Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ besitzt und über diese Domäne direkt mit diesen beiden Untereinheiten interagiert, was auf die Rolle von p115 RhoGEF als möglicher Effektor in der Signalkaskade von $G\alpha_{12/13}$ schließen ließ (Kozasa *et al.*, 1998, Hart *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde der durch p115 RhoGEF katalysierte Guaninnukleotid-Austausch an Rho jedoch nur durch $G\alpha_{13}$ stimuliert, und nur $G\alpha_{13}$, nicht jedoch $G\alpha_{12}$, steigerte synergistisch die durch p115 RhoGEF stimulierte Aktivierung der SRF-vermittelten Gentranskription (Hart *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1998a), was darauf hindeutet, daß die Aktivierung von Rho durch $G\alpha_{12}$ über einen anderen Austauschfaktor verläuft. Daneben konnte kürzlich ein weiteres GEF, PDZ-RhoGEF, identifiziert werden, welches ebenfalls eine RGS-Domäne besitzt und über diese direkt an $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ bindet (Fukuhara *et al.*, 1999). Dieses GEF war wie p115 RhoGEF in der Lage, die Rho-abhängige SRF-vermittelte Gentranskription zu stimulieren, und eine in der katalytischen Domäne deletierte Mutante von PDZ-RhoGEF wirkte dominant negativ auf die durch $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ induzierte SRF-Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, daß in NIH 3T3-Zellen die beiden Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Tec und Bmx in die durch $G\alpha_{12/13}$ induzierte und über Rho vermittelte Aktivierung des "serum response factor" eingeschaltet sind (Mao *et al.*, 1998c), und daß in HeLa-Zellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über $G\alpha_{13}$ unter Beteiligung der Tyrosin-Kinase Pyk2 die SRF-vermittelte Gentranskription stimulieren (Shi *et al.*, 2000). Schließlich könnte in HeLa-Zellen die Phosphoinositid-3-Kinase über Rac und Rho an der SRE-Aktivierung beteiligt sein (Wang *et al.*, 1998).

Während die Beteiligung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ an der Kontrolle von Rho-abhängigen Prozessen recht gut belegt werden konnte, ist die Rolle der anderen G-Protein- α -Untereinheiten noch weitgehend unklar. In den meisten untersuchten Zelllinien konnte $G\alpha_q$ keine Stimulation von Signaltransduktionswegen zur Aktivierung von Rho bewirken (Buhl *et al.*, 1995; Katoh *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1998a; Plonk *et al.*, 1998). Untersuchungen zur Beteiligung von $G\alpha_q$ führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Zumindest in einigen Systemen scheint $G\alpha_q$ die Aktivierung von Rho infolge der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu vermitteln. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß $G\alpha_q$ in Fibroblasten nicht in der Lage war, SRF zu aktivieren und die Bildung von Aktin-Streßfasern zu bewirken (Buhl *et al.*, 1995; Fromm *et al.*, 1997; Gohla *et al.*, 1998). Andere Studien mit Plättchen oder Fibroblasten von Wildtyp- und $G\alpha_{q/11}$ -defizienten Mäusen zeigten, daß die Aktivierung verschiedener Rezeptoren, die an $G\alpha_{q/11}$ koppeln, wie der Rezeptor für Thrombin, LPA und Thromboxan A_2 , auch in Abwesenheit von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ zu Änderungen des Cytoskeletts führten (Klages *et al.*, 1999; Gohla *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit diesen Befunden hemmten Antikörper gegen $G\alpha_q$ nur schwach die Rho-abhängigen Effekte von LPA und Thrombin auf das Cytoskelett (Gohla *et al.*, 1998; Majumdar *et al.*, 1999). Andererseits war die durch Stimulation des M_1 mAChR induzierte Bildung von Aktin-Streßfasern in Mausfibroblasten abhängig vom Vorkommen von $G\alpha_{q/11}$ (Gohla *et al.*, 1999). Des weiteren existiert in PC12-Zellen ein Signalweg, bei dem die Aktivierung von $G\alpha_q$ über Rho in Abhängigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} und PKC zu morphologischen Veränderungen der Zellen führt (Katoh *et al.*, 1998). Die Rho-abhängige Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren konnte ebenfalls durch die Expression von aktiviertem $G\alpha_q$ und durch Stimulation des M_1 mAChR oder des α_1 -Adrenozeptors in Wildtyp-, nicht jedoch in $G\alpha_q$ -defizienten Zellen induziert werden (Mao *et al.*, 1998a und b).

Wie für die anderen kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie auch, so existieren für die Rho-GTPasen Faktoren, die durch direkte Interaktion mit den Rho-Proteinen den Guaninnukleotid-Austausch negativ (GDIs und GAPs) oder positiv (GEFs) regulieren. Da zahlreiche verschiedene Faktoren bekannt sind, liegt es nahe, daß mehrere divergente Signalkaskaden für die verschiedenen Funktionen der Rho-Proteine existieren. Der erste identifizierte GDI für die Mitglieder der Rho-Familie war das ubiquitär exprimierte Protein

Rho-GDI, welches als cytosolisches Protein bevorzugt mit GDP-gebundenem Rho, Rac und Cdc42 assoziiert und dadurch die Dissoziation von GDP und den GDP/GTP-Austausch hemmt (Fukumoto *et al.*, 1990; Ueda *et al.*, 1990; Abo *et al.*, 1991; Hori *et al.*, 1991; Leonard *et al.*, 1992). Weitere Studien zeigten, daß Rho-GDI ebenfalls in der Lage ist, an die GTP-gebundenen Formen der Rho-GTPasen zu binden und damit deren intrinsische und die durch GAPs stimulierte GTPase-Aktivität der Rho-Proteine zu hemmen (Hart *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1993; Hancock & Hall, 1993). In unstimulierten Zellen sind Rho-Proteine im Cytosol mit Rho-GDIs assoziiert, nach Stimulation der Zellen lösen sie sich aus der Bindung und werden an Zellmembranen transloziert, wobei der genaue Mechanismus hierbei noch nahezu unbekannt ist (Takai *et al.*, 1995). In den letzten Jahren wurden noch zwei weitere GDIs identifiziert, wobei es sich zum einen um das ausschließlich in hematopoetischen Geweben exprimierte Ly-GDI (Lelias *et al.*, 1993; Scherle *et al.*, 1993) und zum anderen um das vornehmlich in Gehirn und Pankreas exprimierte Rho-GDI γ handelt (Adra *et al.*, 1997). Obwohl GDIs gegenüber den einzelnen Rho-GTPasen nur wenig spezifisch sind, besitzen sie einige Domänen in ihrer Proteinsequenz, die durch Serin/Threoninkinasen modifiziert werden können und somit eine regulatorische Funktion der Rho-GDIs vermuten lassen (Olofsson, 1999). Die GAPs regulieren die Inaktivierung der monomeren GTPasen, indem sie wie erwähnt deren intrinsische GTPase-Aktivität beschleunigen. Das schon länger bekannte, ubiquitär exprimierte p50 RhoGAP bevorzugt Rac gegenüber seinen weiteren Substraten RhoA und Cdc42 (Lancaster *et al.*, 1994). Vor kurzem konnten einige weitere GAPs identifiziert werden, die spezifisch mit Rho interagieren. Zu diesen zählen das ubiquitär exprimierte Graf, welches durch die "mitogen-activated protein" Kinase phosphoryliert werden kann und am Aktin-Cytoskelett lokalisiert ist (Taylor *et al.*, 1998), das ubiquitär exprimierte p190-RhoGAP, welches durch Tyrosin-Kinasen phosphoryliert wird und ebenfalls am Aktin-Cytoskelett lokalisiert ist (Chang *et al.*, 1995; Roof *et al.*, 1998), und p122-RhoGAP, welches bei transienter Transfektion von oder Mikroinjektion in Swiss 3T3-Zellen die durch LPA stimulierte Rho-abhängige Bildung von Aktin-Streßfasern hemmte (Sekimata *et al.*, 1999).

Besonders groß scheint die Zahl der bislang beschriebenen Rho-GEFs zu sein, die den Guaninnukleotid-Austausch positiv regulieren und eine Schlüsselrolle bei Signaltransduktionswegen zur Aktivierung von Rho-GTPasen einnehmen (Cerione & Zheng,

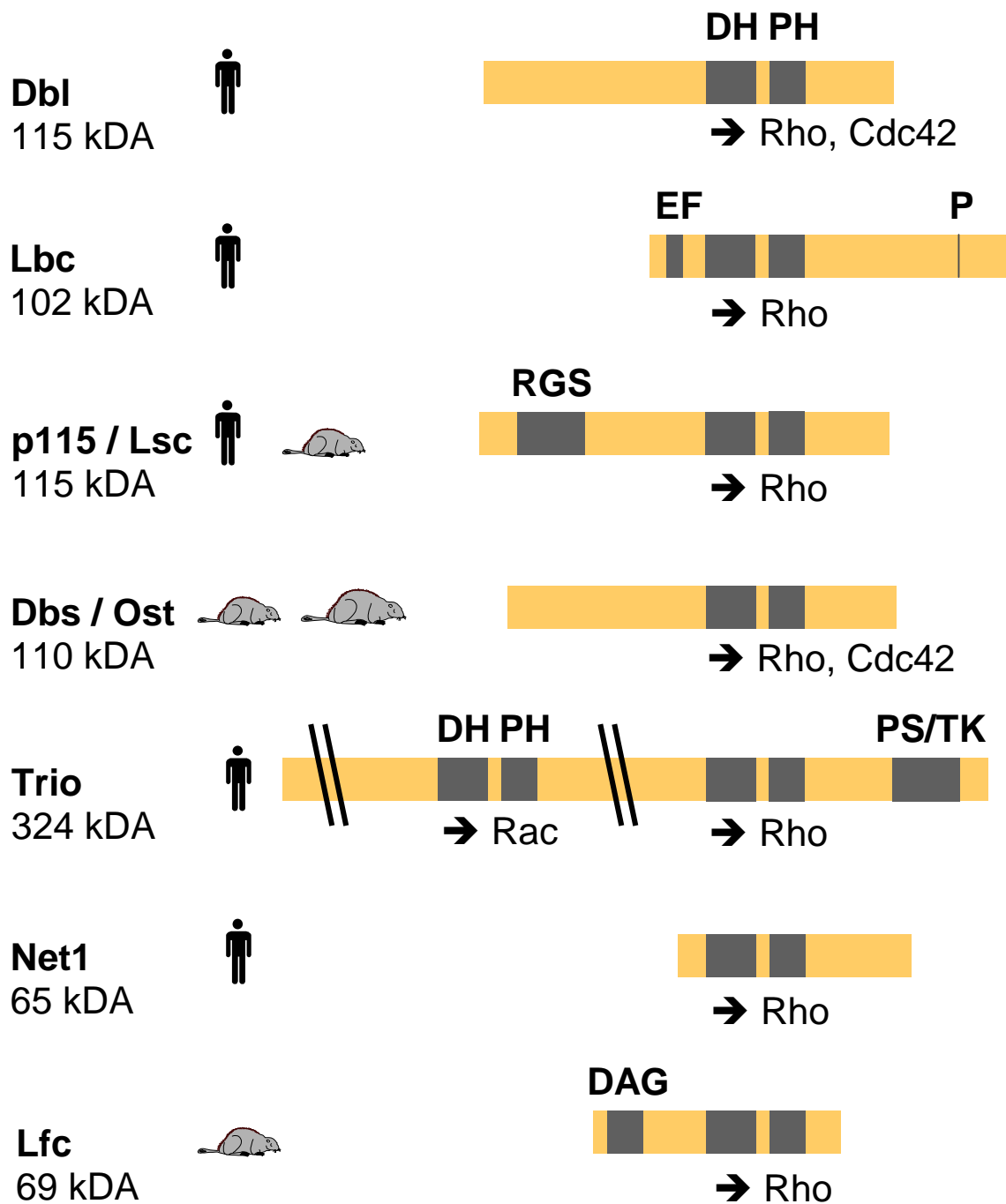
1996; Whitehead *et al.*, 1997; Stam & Collard, 1999).

1.6 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho-GTPasen

Die Familie der Rho-GEFs umfaßt mittlerweile bereits etwa 30 Mitglieder. Viele dieser bekannten GEFs, wie der erste Vertreter Dbl, Ost, Lbc, Lsc und Lfc sind Produkte von (Proto-)Onkogenen, die aufgrund ihres transformierenden Potentials bei Überexpression oder Expression verkürzter Varianten in NIH 3T3-Fibroblasten isoliert wurden (Quilliam *et al.*, 1995; van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997). Als funktionelle Regulatoren katalysieren Rho-GEFs den GDP/GTP-Austausch an Rho-GTPasen, wodurch diese aktiviert werden. Dabei stimulieren Rho-GEFs die Freisetzung des gebundenen GDP von den kleinen GTPasen offenbar durch Bindung und Stabilisierung des nukleotidfreien Zustands der GTPasen (Glaven *et al.*, 1996). Während einige Rho-GEFs für bestimmte GTPasen spezifisch sind, also nur auf Rho, Rac oder Cdc42 wirken, katalysieren andere dieser Austauschfaktoren die Aktivierung mehrerer verschiedener Rho-GTPasen. Einige GEFs werden vorzugsweise in spezifischen Zelllinien und Geweben oder nur in bestimmten Phasen der Entwicklung exprimiert, was vermuten läßt, daß diese Rho-GEFs an der Regulation verschiedener zelltyp- und gewebespezifischer Effekte beteiligt sind (Cerione & Zheng, 1996; Whitehead *et al.*, 1997; Stam & Collard, 1999). Als gemeinsames Strukturmotiv besitzen alle Rho-GEFs eine nach dem Prototyp Dbl benannte "Dbl homology" (DH)-Domäne aus etwa 180 Aminosäuren. Für einige Rho-GEFs konnte gezeigt werden, daß verkürzte Varianten, die nur noch die DH-Domäne exprimierten, in der Lage waren, *in vitro* den Guaninnukleotid-Austausch an Rho-Proteinen zu katalysieren, eine Deletion innerhalb der DH-Domäne führte jedoch zu einem Verlust der Austauschaktivität (Hart *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 1995). Des weiteren zeigten funktionelle Untersuchungen, daß Mutanten, die innerhalb der DH-Domäne deletiert waren, ihre transformierende Aktivität in NIH 3T3-Zellen verloren (Ron *et al.*, 1991; Horii *et al.*, 1994; Whitehead *et al.*, 1995a und b, Hart *et al.*, 1996). Die DH-Domäne scheint somit hinreichend und notwendig für die katalytische Aktivität zu sein. Zusätzlich zur DH-Domäne besitzen alle bisher beschriebenen Rho-GEFs eine etwa 100 Aminosäuren umfassende, C-terminal benachbarte "Pleckstrin homology" (PH)-Domäne, die ursprünglich als doppeltes

Strukturmotiv in Pleckstrin gefunden wurde, dem Substrat der PKC in Plättchen. Diese auch in vielen anderen Proteinen vorkommende PH-Domäne vermittelt offenbar Protein/Protein- und/oder Protein/Lipid-Interaktionen. Es konnte gezeigt werden, daß die PH-Domäne *in vitro* an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, Membranlipide wie PtdIns(4,5)P₂ oder verschiedene PKC-Isoformen bindet (Musacchio *et al.*, 1993; Harlan *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1994; Touhara *et al.*, 1994; Lemmon *et al.*, 1995; Blomberg *et al.*, 1999). Möglicherweise könnte die PH-Domäne somit für die subzelluläre Lokalisation der GEFs verantwortlich sein. Mutanten verschiedener Rho-GEFs, denen entweder ein Teil oder die gesamte PH-Domäne fehlte, waren bei Expression in NIH 3T3-Fibroblasten nicht mehr transformierend (Ron *et al.*, 1991; Horii *et al.*, 1994; Whitehead *et al.*, 1995a und b, Hart *et al.*, 1996). Außerhalb des Tandems aus DH- und PH-Domäne besitzen die verschiedenen Rho-GEFs wenig strukturelle Ähnlichkeiten. Viele Vertreter der Dbl-Familie enthalten zusätzlich noch weitere funktionelle Domänen, wie eine Calcium-bindende EF-Hand, eine Protein-Serin-/Threonin-Kinase-Domäne oder eine Diacylglycerol-bindende Domäne, die möglicherweise an der Regulation der GEF-Aktivität beteiligt sind (Toksoz & Williams, 1994; Whitehead *et al.*, 1995a; Debant *et al.*, 1996). Mit p115 RhoGEF wurde, wie oben erwähnt, das erste GEF mit Homologie zu den RGS-Proteinen und GAP-Aktivität gegenüber G α_{12} und G α_{13} beschrieben (Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998). Abb. 1 zeigt die schematische Darstellung einiger der bislang bekannten Rho-GEFs.

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho-GTPasen der Dbl-Familie. Dargestellt sind die aus verschiedenen Spezies [Mensch, Maus (kleines Symbol), Ratte (großes Symbol)] klonierten Austauschfaktoren mit ihren kalkulierten Molekulargewichten, die aus Homologie-Untersuchungen abgeleiteten, potentiell funktionellen Domänen sowie die Rho-GTPasen, an denen der Guaninnukleotid-Austausch katalysiert wird. DH, "Dbl homology"-Domäne; PH, "Pleckstrin homology"-Domäne; EF, Calcium-bindende EF-Hand; P, Prolin-reiche Region; RGS, "Regulator of G protein signalling"-Domäne; PS/TK, Protein-Serin-/Threonin-Kinase-Domäne; DAG, Diacylglycerol-bindende Domäne.



1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der anzufertigenden Arbeit war es, neue GEFs für GTPasen der Rho-Familie zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Dabei sollten zum einen zwei bislang nicht weiter untersuchte, potentielle GEFs für Rho-GTPasen, deren cDNAs durch Zusammenarbeit mit dem japanischen Kazusa-DNA-Forschungsinstitut zur Verfügung standen, charakterisiert werden. Zum anderen bestand ein wesentlicher Teil der Arbeit darin, die cDNA für ein unbekanntes Protein mit Homologien zu den bekannten Rho-GEFs aus einer cDNA-Bibliothek durch Homologie-Klonierung zu isolieren und anschließend zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um ein funktionelles Rho-GEF handelt. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Aktin-Cytoskeletts wurden humane Harnblasenkarzinomzellen der Linie J82 verwendet, die sich aufgrund ihrer Größe hierzu gut eignen. Für andere Untersuchungen wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil den M₂ oder M₃ mAChR und zudem endogen eine Vielzahl anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, u.a. für LPA, exprimieren. Zuerst sollte die Expression der drei neuen, potentiellen GEFs in verschiedenen humanen Geweben mit Hilfe eines Northern Blots sowie das Vorkommen in den für unsere Untersuchungen verwendeten J82- und HEK293-Zellen mittels reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion überprüft werden. Um die Aktivität der GEFs in intakten Zellen nachzuweisen, wurden zunächst die Effekte ihrer (Über-)Expression auf die Organisation des Aktin-Cytoskeletts in J82-Zellen untersucht. Für die genauere Charakterisierung der Aktivität und Spezifität der Proteine sollten dann auch *in-vitro*-Versuche durchgeführt werden, in denen die Stimulation des Guaninnukleotid-Austausches an Rho-GTPasen durch die aus Sf9-Insektenzellen aufgereinigten GEFs sowie die direkte Interaktion der GEFs mit den Rho-Proteinen untersucht wurden. Zum weiteren Nachweis der Aktivierung von Rho-GTPasen durch diese GEFs *in vivo* sollte schließlich die Stimulation der über den Transkriptionsfaktor SRF vermittelten Gentranskription bestimmt werden. Dabei wurde auch die Wirkung verschiedener klonierter, verkürzter oder deletierter Varianten dieser neuen Proteine auf die Aktivierung der Gentranskription untersucht, mit Hilfe derer geklärt werden sollte, ob die neuen GEFs an Signaltransduktionswegen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beteiligt sind, über welche Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine diese Aktivierung möglicherweise verläuft und welche funktionellen und regulatorischen Molekülteile und Domänen dabei für

die GEF-Aktivität der Proteine von Bedeutung sind.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
Acrylamid	Serva
Agarose	Gibco BRL
Ampicillin (Binotal [®])	Grünenthal
APP-PNP	Roche
Aprotinin	Sigma
APS	Serva
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Biomol
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Carbachol	Sigma
Chloroform	J. T. Baker
Chloroquin	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DMSO	Sigma
dNTPs	Roche
DTT	Serva
ECL-Westernblot-Reagenz	Amersham
EDTA	Merck
EGTA	Serva
Essigsäure (96 %)	Merck
Ethanol	J. T. Baker

Ethidiumbromid	Sigma
Ethylenglykolmonomethylether	Merck
Ficoll 400	Sigma
FKS	Gibco BRL
Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
GDP	Roche
Gelatine	Merck
Glutathion	Sigma
Glutathion-Sepharose-"Beads"	Pharmacia Biotech
Glycerol	Merck
Glycin	Sigma
GTP	Roche
GTP γ S	Roche
G418	Gibco BRL
Guanidiniumisothiocyanat	Merck
HEPES	Sigma
Hexanukleotide	Roche
IPTG	Stratagene
Isoamylalkohol	Fluka
Isopropanol	Fluka
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma
Lachssperma-DNA	Sigma
N-Laurylsarkosin	Fluka
LB-Agar/-Medium	Gibco BRL
Leupeptin	Fluka
Lipofectin® Reagent	Gibco BRL
LPA	Sigma

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maltose	Merck
MEM	Gibco BRL
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J. T. Baker
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva
Molekulargewichtsstandard	Sigma
MOPS	Merck
Mowiol	Calbiochem
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Oligonukleotide	Eurogentec/Sigma
Orange G	Sigma
Paraffinöl	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phenol	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid	Boehringer Mannheim
Phosphorsäure	Merck
PMSF	Roche
Polyvinylpyrrolidon	Merck
Ponceau S	Sigma
Proteinstandard: lyophilisiertes Rinder- γ -Globulin	Biorad
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
SDS	Serva

Serva Blue G	Serva
SOC-Medium	Gibco BRL
TEMED	Serva
TNM-Medium	Sigma
Tris	Biomol
TRITC-Phalloidin	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco BRL
Tween 20	Sigma

2.1.2 Radioaktive Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
[8- ³ H]GDP (10 Ci/mmol)	Amersham
[α- ³² P]-dCTP (> 6000 Ci/mmol)	NEN
[³⁵ S]GTPγS (1250 Ci/mmol)	NEN

2.1.3 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
Anti-c-Myc-Antikörper (aus Maus)	Calbiochem
Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat (aus Ziege)	Sigma
Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (aus Ziege)	Jackson Immuno Research

2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
Alkalische Phosphatase	Roche

DNase I	Roche
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Gibco BRL
MMLV Reverse Transkriptase	Gibco BRL
Restriktionsendonukleasen mit geeigneten 10x Puffern	Gibco BRL, Stratagene, MBI Fermentas, Roche
RNase A	Sigma
<i>T₄</i> -DNA-Ligase mit 10x Ligationspuffer	Promega
<i>Taq</i> DNA-Polymerase mit 10x PCR-Puffer	MBI Fermentas

2.1.5 Plasmide

Bezeichnung

GST-RhoA WT (pGEX-2T)	Dr. Alan Hall,
myc-RhoA V14 (pEXV)	University College London,
GST-Rac1 WT (pGEX-2T)	London, U.K.
myc-Rac1 V12 (pEXV)	
myc-Rac1 N17 (pEXV)	
GST-Cdc42 WT (pGEX-2T)	
myc-Cdc42 V12 (pEXV)	
myc-Cdc42 N17 (pEXV)	
myc-C3-Transferase (pEF)	
pRL-TK	Promega
pSRE.L	J. Mao and Dr. D. Wu,
	University of Rochester, NY
G α_{12} (pCis)	Dr. T. Wieland,
G α_{13} (pCis)	Universitäts-Krankenhaus
G α_q RC (pCis)	Eppendorf, Hamburg
G β_1 (pcDNA3)	Dr. D. Roskopf,
G γ_2 (pcDNA3)	Uniklinik Essen

2.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
Chromatographie-/Blotpapier	Whatman
Deckgläser 24 x 60 mm	Engelbrecht
Emulsifier Scintillator Plus	Packard
Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE	Agfa Gevaert
Filmfixierer Lösung Tetenal Roentogen Superfix	Tetenal
Kodak X-OMAT AR-Filme	Kodak
Nitrocellulosemembranen	Advanced Microdevices
Nitrocellulosefilter	Advanced Microdevices
Pasteurpipetten	Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastik-Einmalküvetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 3,5 ml und 6,5 ml)	Sarstedt
Sterilfilter	Sartorius
Szintillationsgefäße	Packard
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung (LaminAir HA 2472 GS, Heraeus) durchgeführt. Die Keimfreiheit der benötigten Arbeitsgeräte, Glas- und Plastikwaren sowie Lösungen und Medien wurde durch Autoklavieren (121°C, 2 bar für 20 min) bzw. durch Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm) erreicht. Die verwendeten Materialien wie Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen und Pipetten waren sterile Einmalware aus Plastik (Falcon).

2.2.1.1 Kultivierung der HEK293-Zellen

Für einige der durchgeführten Versuche wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit einem Plasmid zur Expression des humanen M2 bzw. M3 Subtyps des mAChRs und einem Plasmid (pRSVNeo), welches die Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin vermittelt, transfiziert worden waren, und den M2 mAChR in einer Dichte von 120.000 Rezeptoren pro Zelle bzw. den M3 mAChR in einer Dichte von 200.000 Rezeptoren pro Zelle stabil exprimieren (Peralta *et al.*, 1988). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/F-12 als Wachstumsmedium, dem 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt worden waren, in einem Brutschrank (Heraeus) mit feuchter Atmosphäre bei 5 % (v/v) CO₂ und 37°C. Stocks der stabil transfizierten Zellen wurden in 145 mm-Zellkulturschalen mit 20 ml Wachstumsmedium gehalten, dem zur Selektion der Zellen, die den M2 bzw. M3 mAChR exprimieren, das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) in einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt wurde. Durch mehrfaches Aufpipettieren von Wachstumsmedium wurden die Zellen zur anschließenden Subkultivierung abgelöst und für die Versuche in 145 mm-Zellkulturschalen mit 20 ml Wachstumsmedium ohne G418 bis zur nahen Konfluenz kultiviert.

Zum Einfrieren der HEK293-Zellen für die anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen einer 145 mm-Zellkulturschale in 10 ml Wachstumsmedium abgelöst und nach einer Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0 R, 1700 Upm, 5 min, RT) in 1 ml Einfriermedium [45 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO, 45 % (v/v) DMEM/F-12]

resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde in einem Kryoröhrchen bei -70°C für 24 h zwischengelagert, ehe sie in den Stickstofftank überführt wurde. Beim Ausfrieren der Zellen wurde ein Kryoröhrchen rasch aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Zum Entfernen des DMSO wurde die Suspension wie oben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in einer 145 mm-Zellkulturschale für einen Tag anwachsen gelassen. Nach erfolgter Anhaftung der Zellen wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden mittels G418 selektioniert. Vor dem Einsatz für Versuche erfolgte eine erneute Splittung.

2.2.1.2 Kultivierung der J82-Zellen

Humane Harnblasenkarzinomzellen der Zelllinie J82 (O'Toole *et al.*, 1978) wurden in "Minimal essential medium" (MEM) als Wachstums-medium mit 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin G und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin in einem Brutschrank (Heraeus) mit feuchter Atmosphäre bei 5 % (v/v) CO_2 und 37°C kultiviert. Dazu wurden die Zellen in 145 mm-Zellkulturschalen mit 20 ml Wachstumsmedium gehalten. Für die anschließende Subkultivierung wurde das Wachstumsmedium über den J82-Zellen abgesaugt, und die Zellen wurden einmal mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) ohne Calcium- und Magnesiumionen gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit 1,5 ml 0,5 % (m/v) Trypsin/0,2 % (m/v) EDTA für etwa zwei Minuten bei 37°C inkubiert, woraufhin die Zellen durch mehrfaches Aufpipettieren von 10 ml Wachstumsmedium leicht abgespült werden konnten. Nach anschließender Zentrifugation zum Entfernen des Trypsins (Heraeus Megafuge 1.0 R, 5 min, 1700 U/min, RT) wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde auf eine neue Zellkulturschale mit je 20 ml Wachstumsmedium verteilt. Für Untersuchungen des Aktin-Cytoskeletts wurden die J82-Zellen einer 60 mm-Zellkulturschale nach der Transfektion wie oben beschrieben abgelöst, zentrifugiert und in 7 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der Suspension mit 50 ml neuem Wachstumsmedium verdünnt. Von dieser Suspension wurden 350 bzw. 750 μl pro Brunnen eines Objektträgers für die Mikroskopie (*Culture Slide*, Falcon) verteilt.

Zum Einfrieren der J82-Zellen für die anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen einer 145 mm-Zellkulturschale wie oben beschrieben abgelöst

und die Zellzahl bestimmt. Nach einer Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0 R, 5 min, 1700 U/min, RT) wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in Einfriermedium [10 % (v/v) FKS, 20 % (v/v) DMSO, 70 % (v/v) MEM] resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, bei -70°C über Nacht gelagert und dann in den Stickstofftank überführt. Beim Ausfrieren der Zellen wurde ein Kryoröhrchen schnell aufgetaut und die Zellsuspension in 15 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation zum Entfernen des DMSO (wie zuvor) wurden die Zellen in 20 ml Wachstumsmedium resuspendiert und bis zur Subkultivierung wachsen gelassen.

PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}): 148 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4
pH 7,2

2.2.1.3 Kultivierung der Sf9-Zellen

Die Kultivierung von Insektenzellen der Linie Sf9 erfolgte in der Regel in 75 cm^3 -Zellkulturflaschen mit 12 ml TNM-Medium, dem 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin zugesetzt waren, in einem Brutschrank bei 27°C . Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen je nach Konfluenz gesplittet. Hierzu wurden die dicht gewachsenen Zellen in dem vorhandenen Wachstumsmedium durch kräftiges, mehrfaches Aufpipettieren des Mediums abgelöst und anschließend auf zwei bis vier Zellkulturflaschen verteilt. Die Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren zur Expression und Gewinnung von rekombinanten Proteinen erfolgte in 175 cm^3 -Zellkulturflaschen mit 30 ml Wachstumsmedium (siehe 2.2.15).

2.2.2 Synthese von Erststrang-cDNA

2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus HEK293- und J82-Zellen

Für alle Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich Lösungen verwendet, die mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat behandeltem und anschließend mehrfach autoklaviertem Wasser angesetzt worden waren. Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt. Verwendete Plastikware wurde direkt der Originalverpackung entnommen und galt als RNase-frei.

Zur Präparation der gesamten zellulären RNA aus HEK- bzw. J82-Zellen wurden die konfluenten Zellen einer 145 mm-Zellkulturschale mit 4 ml GTC-Puffer direkt in der Schale lysiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Boden der Schale abgelöst. Die erhaltene Suspension wurde zum vollständigen Zellaufschluß noch mehrmals durch eine G20-Kanüle gedrückt und anschließend in ein 12 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 400 µl 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0) und 4 ml wassergesättigtem Phenol wurden die Phasen bis zur Homogenität gemischt. Anschließend wurden 800 µl Chloroform:Isoamylalkohol (49:1) zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 15 min auf Eis gestellt. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 10.000 U/min (Sorvall RC-5B). Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, und die RNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (wie zuvor) wurde das Pellet in 600 µl GTC-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für eine weitere Fällung wurde erneut 1 Vol. Isopropanol zugegeben und der Ansatz über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge, 10 min, 13.000 U/min, RT) sedimentiert. Das Pellet wurde danach mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei RT einige Minuten lang getrocknet und schließlich in 50 µl Wasser aufgenommen. Um zu gewährleisten, daß die RNA vollständig gelöst war, wurde der Ansatz noch für 10 min auf 65°C erhitzt, bevor mittels UV-Spektrophotometrie (Photometer Ultraspec 1000 der Fa. Pharmacia Biotech) Ausbeute und Reinheit der Präparation bestimmt wurden.

GTC-Puffer: 4 M Guanidiniumisothiocyanat
0,5 % (m/v) N-Laurylsarkosin
25 mM Natriumcitrat
100 nM β -Mercaptoethanol
pH 7,0

2.2.2.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Zur Untersuchung der Integrität der isolierten RNA wurde eine Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Formaldehyd-Agarosegelen [1,8 % (v/v) Formaldehyd, 1 % (m/v) Agarose] durchgeführt. Als Puffer wurde 50 mM MOPS (pH 7,0) verwendet. Vor dem Auftragen wurden 1-5 μ g RNA mit 20 μ l Probenpuffer gemischt, 15 min bei 65°C denaturiert und anschließend rasch auf Eis abgekühlt, bevor jeweils 1 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei RT für 1-2 h mit einer angelegten Spannung von 80 V.

Probenpuffer: 20 mM MOPS
5 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
53 % (v/v) Formamid
6,25 % (v/v) Formaldehyd
7 % (v/v) Glycerol
0,5 % (m/v) Bromphenolblau

2.2.2.3 Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Für die cDNA-Synthese wurde die wie oben beschrieben präparierte gesamtzelluläre RNA eingesetzt. Als "Primer" für die verwendete Reverse Transkriptase wurden Hexanukleotide als "Random primer" verwendet. 2 μ g RNA wurden 5 min bei 80°C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurde die RNA in einem Gesamtvolumen von 25 μ l mit 1x Reaktionspuffer, 10 mM DTT, 20 U RNase-Inhibitor, 400

ng "random primer" und den verschiedenen dNTPs (jeweils 1 mM) gemischt. Durch die Zugabe von 200 U MMLV Reverse Transkriptase wurde die Reaktion gestartet. Nach 60 min bei 37°C wurde das Enzym durch 5-minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reaktionspuffer (5x): 250 mM Tris-HCl
375 mM KCl
15 mM MgCl₂
pH 8,3

2.2.3 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde der folgende Grundansatz verwendet:

Σ 50 µl	2 µl cDNA-Ansatz als Matrize
	4 µl (40 pmol) Primer 1
	4 µl (40 pmol) Primer 2
	5 µl PCR-Puffer (10X) ohne MgCl ₂
	3 µl 25 mM MgCl ₂
	1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
	2,5 U <i>Taq</i> DNA-Polymerase
	x µl H ₂ O

Die für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Oligonukleotide wurden als Lyophilisat erhalten. Nach Aufnahme in Aqua bidest. wurde die Konzentration der Oligonukleotide durch UV-Spektrophotometrie bei 260 nm bestimmt und für die PCR eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Der angegebene Grundansatz wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel zusammenpipettiert und mit 50 µl Paraffinöl überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte in einem DNA-Thermocycler 60 der Fa. Biomed. Im ersten Schritt zum Aufschmelzen der DNA-Stränge wurden die Ansätze zunächst für 3 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden 35 Reaktionszyklen nach folgenden Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt: Denaturierung, 95°C, 1 min; "Annealing", etwa 2-3°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer, 1 min; Elongation, 72°C, 2 min. In einem letzten Schritt

wurden die Ansätze zur Vervollständigung aller DNA-Stränge 15 min bei 72°C inkubiert.

PCR-Puffer (10x): 500 mM KCl
100 mM Tris-HCl
pH 8,8

2.2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten aus der PCR oder einer Restriktion (vgl. 2.2.9.1) dienten 1%ige (m/v) Agarosegele. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die zur Elektrophorese angelegte Spannung betrug zwischen 80 und 120 V. Die Elektrophoresezeiten wurden den Trennproblemen angepaßt.

TBE-Puffer (10x): 0,9 M Tris-HCl
0,9 M Borsäure
25 mM EDTA
pH 8,0

2.2.5 Untersuchung von cDNA-Bibliotheken

2.2.5.1 Herstellung von Wirtsbakterien-Stammsuspensionen für Lambda-Phagen

Zur Anzucht wurden 6 x 5 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose unter sterilen Bedingungen mit jeweils einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes (*E. coli* Y 1090) angeimpft und für etwa 6 h bei 37°C im Warmluftschüttler (180 U/min) inkubiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm wurden die Bakterien sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, 4.000 U/min, 5 min, RT) und anschließend das erhaltene Bakteriensediment bis zu einer optischen Dichte von 2,0 (600 nm) in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose resuspendiert.

LB-Medium: 20 g LB-Broth-Base
ad 1 l Aqua bidest.
pH 7,4

2.2.5.2 Beschreibung der verwendeten Bibliotheken

Zur Untersuchung mittels Nukleinsäurehybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion wurde eine humane cDNA-Bibliothek aus fetalem Gehirn (Human Fetal Brain 5'-STRETCH PLUS cDNA Library, Clontech) verwendet. Sie wurde laut Hersteller aus mRNA ganzer, gesunder Gehirne von 5 spontan fehlgeborenen männlichen bzw. weiblichen Kaukasiern erhalten, mit *Eco* RI-Adaptoren versehen und λ gt11 als Vektor einkloniert. Die Zahl der unabhängigen Klone betrug $2,0 \times 10^6$, wobei die Größe der einklonierten cDNA zwischen 0,6 und 3,5 kb lag. Als Wirtsbakterienstamm dieser Bibliothek diente *E. coli* Y 1090. Die Phagen-Dichte der Bibliothek wurde wie im folgenden Abschnitt beschrieben bestimmt.

2.2.5.3 Titerbestimmung der verwendeten Phagen-Bibliothek

Zur Titerbestimmung der verwendeten Phagen-Bibliothek, d. h. zur Ermittlung der Anzahl an rekombinanten Phagen pro ml Phagenstammlösung, wurden eine 1:250-fache und eine 1:125.000-fache Verdünnung dieser Stammlösung hergestellt. Je 2, 5 und 10 μ l der 1:125.000-fachen Verdünnung wurden zusammen mit 100 μ l λ -Puffer und 200 μ l einer wie oben beschrieben erhaltenen Bakterien-Stammsuspension von *E. coli* Y 1090 15 min bei 37°C vorinkubiert anschließend mit je 4 ml auf 45°C erwärmter LB-Top-Agarose mit 10 mM MgSO_4 auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit 10 mM MgSO_4 (\varnothing 90 mm) verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die Phagenplaques ausgezählt.

λ -Puffer: 1,0 M NaCl
0,1 M MgSO_4
1,0 M Tris-HCl
0,01 % (m/w) Gelatine
pH 7,5

LB-Agar-Platten: 32 g LB-Agar
ad 1 l Aqua bidest.

LB-Top-Agarose: 1 l LB-Medium
7,2 g Agarose

2.2.5.4 Ausplattieren der Phagen-Bibliothek und Herstellung der Filterabzüge

Die verwendete Bibliothek wurde auf 20 große LB-Agar-Platten mit 10 mM MgSO_4 (\varnothing 145 mm) mit jeweils 50.000 Phagenplaques pro Platte ausplattiert. Hierzu wurde pro Platte die entsprechende Menge der 1:250-fachen Verdünnung der Phagen-Bibliothek mit 100 μl λ -Puffer und 600 μl der Bakterien-Stammsuspension (OD_{600} 2,0) 15 min bei 37°C vorinkubiert und nach Vermischen mit 7 ml auf 45°C temperierter LB-Top-Agarose mit 10 mM MgSO_4 auf der vorgewärmten LB-Agar-Platte mit 10 mM MgSO_4 gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend auf 4°C zum Härten der LB-Top-Agarose abgekühlt. Für die Herstellung der Filterabzüge wurden Nitrocellulosefilter (Hybond-N, Amersham) verwendet. Die Platten und Filter wurden beschriftet, die Filter wurden zum Transfer der Phagen auf die Platte gelegt, und deren Lage wurde durch Einstiche mit einer glühenden Nadel markiert. Nach 2 min wurden die Filter vorsichtig von der Platte abgenommen und mit der Phagenseite nach oben für 7 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt, bevor sie für je 5 min auf ein mit Neutralisationslösung bzw. 2x SSC-Puffer getränktes Filterpapier gelegt wurden. Abschließend wurde die DNA durch Backen der Filter bei 80°C für 2 h im Heizofen fixiert.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisationslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl
pH 8,0

20x SSC: 3,0 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0

2.2.5.5 Markierung mittels PCR-Amplifikation

Die DNA-Amplifizierung mittels PCR wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden anstelle des dNTP-Mixes pro PCR-Ansatz je 1 µl dGTP (10 mM), dATP (10 mM), dTTP (10 mM), sowie 1 µl dCTP (250 µM) und 10 µl [α - 32 P]-dCTP (100 µCi) eingesetzt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und die nicht eingebauten Nukleotide durch Gelfiltration über eine NAPTM-10 Säule (Pharmacia) abgetrennt. Zur Bestimmung der Einbaurate an Radioaktivität wurde 1 µl des Eluats (Volumen des Eluats: 1,5 ml) durch Messung im Szintillationszähler gezählt.

2.2.5.6 Hybridisierung an immobilisierte DNA

Die zur Hybridisierung verwendete radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde wie oben beschrieben mittels PCR-Amplifikation erhalten. Die Filterabzüge wurden nach Befeuchten mit 2x SSC-Puffer bei 42°C 4 h mit 40 ml Hybridisierungslösung zur unspezifischen Blockierung der Filter vorhybridisiert. Die Sonden-DNA wurde 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe des Ansatzes ($> 1 \times 10^7$ cpm) in 40 ml frische Hybridisierungslösung wurden die Filterabzüge damit über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Filter einmal mit Waschlösung 1 für 1 h bei RT und danach je nach gewünschter Stringenz 2-3 mal mit Waschlösung 1, 2 oder 3 bei der geeigneten Temperatur (42-70°C) für je 1 h gewaschen, bis keine Radioaktivität in der Waschlösung mehr nachweisbar war. Die Detektion der Signale auf der Membran erfolgte durch Autoradiographie (siehe 2.2.8).

Hybridisierungslösung: 50 % (v/v) Formamid
5x SSPE
5x Denhardt's Lösung
0,1 % (m/v) SDS
100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA

20x SSPE: 3,0 M NaCl

0,2 M NaH₂PO₄
0,02 M EDTA
pH 7,4

50x Denhardt's Lösung: 0,01 % (m/v) Ficoll
0,01 % (m/v) Polyvinylpyrrolidon
0,01 % (m/v) BSA

Waschlösung 1: 2x SSC
0,5 % (w/v) SDS

Waschlösung 2: 1x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschlösung 3: 0,2x SSC

2.2.5.8 Isolierung von rekombinanten Phagen

Nach der Autoradiographie wurden die auf den Röntgenfilmen erkennbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den LB-Agar-Platten zugeordnet, die Phagen mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in jeweils 500 µl λ-Puffer mit 50 µl Chloroform eluiert und bei 4°C gelagert. Zur Vereinzelung der Phagen wurden für ein erneutes Ausplattieren auf kleinen LB-Agar-Platten (ø 90 mm) 10 µl einer 10⁻⁶-Verdünnung des entsprechenden Phagen pro Platte gewählt. Von diesen Platten wurden erneut Filterabzüge hergestellt, die wie oben beschrieben in gleicher Weise hybridisiert, gewaschen und autoradiographiert wurden. Einzelplaques, die auf dem Röntgenfilm Signale ergaben wurden in 500 µl λ-Puffer mit 50 µl Chloroform eluiert und das gewonnene Eluat bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6 Isolierung von DNA

2.2.6.1 Isolierung von Lambda-Phagen-DNA aus kleinen Lysaten

Für ein kleines Lysat wurde der jeweilige Phage auf 4 großen LB-Agar-Platten mit 10

mM MgSO₄ (ø 145 mm) ausplattiert (siehe 2.2.5.4). Pro Platte wurden 10 µl Phageneluat mit 600 µl Bakteriensuspension (*E. coli* Y 1090⁻, OD₆₀₀ 2,0) und 100 µl λ-Puffer verwendet und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Phagen durch Zugabe von 10 ml λ-Puffer auf jede Platte über Nacht bei 4°C abgelöst. Am nächsten Morgen wurde die von den Platten abgenommene Lösung bei 4.000 U/min für 10 min bei RT zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde mit je 2 µg/ml RNase A und DNase I 15 min bei 37°C inkubiert und danach zentrifugiert (Beckmann L8-55M Ultrazentrifuge, 40.000 U/min, 1 h, 4°C). Das so erhaltene Pellet eines Phagen wurde dann in 300 µl λ-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde auf 25 mM EDTA und 0,25 % (w/w) SDS eingestellt. Nach 10minütiger Inkubation bei 65°C wurde zweimal mit 1 Vol. Phenol und einmal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Danach wurde die Phagen-DNA mit 2,5 Vol. Ethanol bei RT gefällt, sedimentiert (Heraeus Biofuge 13, 13.000 U/min, 5 min, RT) und nach zweimaligem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol in 60 µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

2.2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Anzucht der Bakterien für die Isolation von Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie der plasmidtragenden Bakterien angeimpft und über Nacht im Warmluftschüttler (180 U/min, 37°C) inkubiert. Ein Aliquot von 1,5 ml der Bakterienkultur wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13, 13.000 U/min, 2 min, RT). Das erhaltene Bakteriensediment wurde in 100 µl kaltem Puffer P1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl Puffer P2 versetzt und gemischt, bis eine klare und viskose Lösung entstand. Nach Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer P3 und guter Durchmischung wurde der Ansatz 3 min zentrifugiert (wie zuvor). Der Überstand wurde abgenommen und je einmal mit 200 µl Phenol und Chloroform extrahiert. Dann wurde die

DNA durch Zugabe von 700 µl Ethanol aus dem wässrigen Überstand bei RT gefällt und durch 10-minütige Zentrifugation (wie zuvor) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Die verwendeten Puffer P1, P2 und P3 wurden entweder selbst hergestellt oder käuflich von der Fa. Qiagen erworben.

Die Plasmid-Midipräparation aus 100 ml Kulturmedium und die Plasmid-Megapräparation aus 3 l Kulturmedium erfolgte mit Hilfe des "Qiagen-tip 100"- bzw. des "Qiagen-tip 2500" der Fa. Qiagen nach den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Zur Überprüfung auf eine erfolgreiche Insertion des gewünschten DNA-Fragments wurde eine Restriktion mit nachfolgender Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
pH 8,0

Puffer P2: 200 mM NaOH
1 % (m/v) SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat
pH 5,5

2.2.7 Northern Blot-Analyse

Die Gewebeverteilung der verschiedenen GEFs wurde mit Hilfe eines Northern Blots (Fa. Clontech) untersucht, der in jeder Spur ca. 2 µg poly(A)⁺ RNA aus acht verschiedenen humanen Geweben auf einer Nylon-Membran enthielt. Der Blot wurde mit einer [α -³²P]-dCTP-markierten cDNA-Probe einer Teilsequenz des entsprechenden GEFs hybridisiert, die wie unter 2.2.5.5 beschrieben mittels PCR synthetisiert wurde. Die Hybridisierung (Probe: ca. 1 x 10⁷ cpm) und das anschließende Waschen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

2.2.8 Autoradiographie

Autoradiographien von Northern Blots oder von Filterabzügen zur Detektion von Signalen nach einer Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe wurden mit Röntgenfilmen durchgeführt. Dabei wurden die Blots bzw. die hybridisierten Filterabzüge in Kassetten mit Verstärkerfolie bei -70°C für ca. 8 Tage bzw. über Nacht autoradiographiert.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Schneiden von DNA

Das Schneiden von DNA erfolgte mit der notwendigen Menge an Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei der erforderlichen Temperatur (meist 37°C) für mindestens 1 h. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 75°C für 5 min oder durch die Zugabe von einem Viertel Vol. Auftragspuffer abgestoppt.

Auftragspuffer (5x): 25 % (v/v) Ficoll 400
 1 % (v/v) Orange G

2.2.9.2 Auffüllen einzelsträngiger überhängender 5'-Enden von DNA

Die nach einer Restriktion und einer eventuell anschließenden Aufreinigung nach Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit 20 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und den verschiedenen dNTPs (jeweils $200\text{ }\mu\text{M}$ final) in einem Gesamtvolumen von $50\text{ }\mu\text{l}$ für 1 h im Heizblock bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C abgestoppt.

2.2.9.3 Präparation von Klonierungsvektoren

Von der für die Vektorpräparation eingesetzten Plasmid-DNA wurden 2-3 µg im geeigneten Puffer mit Hilfe der gewünschten Restriktionsenzymen für mindestens 2 h geschnitten. Anschließend wurde der Ansatz auf 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) eingestellt und die Vektorenden durch die Zugabe von 4 U Alkalischer Phosphatase bei 37°C für 1 h dephosphoryliert. Es folgte eine Extraktion mit 1 Vol. Phenol und 1 Vol. Chloroform. Daraufhin wurde die DNA durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an Ethanol ausgefällt, dann einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Mengenabschätzung wurden 1 und 5 µl des Vektors auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.9.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente einer Restriktion wurden durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4) bis zur deutlichen Abtrennung des zu isolierenden Fragmentes von den anderen Fragmenten aufgetrennt. Die Bande des gewünschten DNA-Fragments wurde unter UV-Licht mit einem Skalpel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction"-Kits der Fa. Qiagen nach den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Die DNA wurde mit 30-50 µl EB-Puffer von der Säule eluiert. Zur Mengenabschätzung wurden 1 und 5 µl der erhaltenen Lösung anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

EB-Puffer: 10 mM Tris-HCl
pH 8,5

2.2.9.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden die wie oben beschrieben präparierten Klonierungsvektoren und DNA-Fragmente eingesetzt. 80-120 ng Vektor-DNA wurden in einem Gesamtansatz von 20 µl mit 2 µl Ligationspuffer (10x), 3 U *T*₄-DNA-Ligase und einem 3- bis 6-fachen molaren Überschuß an DNA-Fragment für mindestens 8 h bei 13°C inkubiert. Als Kontrolle diente der

gleiche Ansatz ohne das DNA-Fragment.

Ligationspuffer (10x): 300 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
10 mM ATP
pH 7,8

2.2.9.6 Präparation kompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Übernacht-Kultur des Bakterienstammes *E. coli* DH5 α angeimpft und bei 37°C und 180 U/min im Warmluftschüttler bis zu einer OD (570 nm) von 0,4 inkubiert. Nach Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0 R, 4.000 U/min, 5 min, 4°C) wurden die Bakterien in 150 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung einmal gewaschen und anschließend in 8 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml einer CaCl₂-Lösung mit 40 % (v/v) Glycerol wurden die Bakterien in Aliquots von 200 μ l aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Es wurden Transformationsraten zwischen 2 und 4 x 10⁶/ μ g DNA erhalten.

2.2.9.7 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden 150 μ l kompetente *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz vermischt. Es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis und 1 min bei 42°C im Wasserbad, bevor 400 μ l SOC-Medium zugegeben wurden. Anschließend wurde der Transformationsansatz zunächst für 15 min bei 37°C im Brutschrank und dann für 45 min im Warmluftschüttler (180 U/min, 37°C) inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz auf zwei LB-Platten mit dem erforderlichen Antibiotikum (100 μ g/ml Ampicillin oder 30 μ g/ml Kanamycin) ausgestrichen, und diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Transiente Transfektion von HEK293- und J82-Zellen

Für die transiente Transfektion der Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden an einer Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt, um steriles Arbeiten zu gewährleisten. Für die Transfektion einer 145 mm-Zellkulturschale wurden in der Regel 100 µg Plasmid-DNA in ein steriles Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und mit sterilem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat-Lösung wurde der Ansatz gut gemischt. Anschließend wurde die DNA mit 625 µl Ethanol ausgefällt und sedimentiert (Heraeus Biofuge 13, 13.000 U/min, 10 min, RT), mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol einmal gewaschen und in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. Bei Kotransfektion mehrerer verschiedener DNAs wurden diese nun gemischt, so daß auch in diesem Fall insgesamt 100 µg DNA pro 145 mm-Schale eingesetzt wurden. Die DNA-Lösung wurde mit sterilem Wasser auf 700 µl aufgefüllt und anschließend wurden 300 µl 2 M CaCl₂ und 1 ml 2-fach HeBS-Puffer zugesetzt und kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde für 10 min stengelassen und von Zeit zu Zeit gut geschüttelt. Währenddessen wurden 275 µl einer 10 mM Chloroquin-Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben, bevor das Präzipitat langsam auf die Zellkulturschale verteilt wurde. Nach einer Inkubation von 4 h im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen einmal mit 10 ml Wachstumsmedium gewaschen und nach Zugabe von 20 ml Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert.

HeBS-Puffer (2x): 16,4 g NaCl
11,9 g HEPES
0,252 g NaH₂PO₄
Aqua. bidest. ad 1000 ml
pH 7,05

2.2.11 Untersuchung des Aktin-Cytoskeletts von J82-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für Untersuchungen des Aktin-Cytoskeletts wurden die J82-Zellen auf Objektträger für die Mikroskopie (*Culture Slides*, Falcon) gesplittet und bis zum nächsten Tag inkubiert. Abweichend von obigem Transfektionsprotokoll wurden hierbei nur 20 µg DNA zur

Ausfällung eingesetzt und in 175 µl sterilem Wasser aufgenommen. Entsprechend wurden anschließend für die Präzipitation der DNA 75 µl 2 M CaCl₂ und 250 µl 2-fach HeBS-Puffer zugesetzt. Nach Zugabe von 50 µl 10 mM Chloroquin-Lösung und 5 ml MEM-Wachstumsmedium wurde dieser Ansatz auf die 8 Brunnen eines Culture Slides verteilt. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37°C wurden die Zellen einmal mit Wachstumsmedium gewaschen, und nach Zugabe von 800 µl Medium pro Brunnen 24-48 h im Brutschrank inkubiert.

Dann wurden die Zellen mit 500 µl PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PBS⁺⁺) pro Brunnen einmal gewaschen und mit 3%iger Formaldehyd-Lösung 15 min bei RT fixiert, bevor sie wiederum mit je 500 µl PBS⁺⁺ gewaschen wurden. Die fixierten Zellen wurden mit 200 µl 0,05 % (v/v) Triton X-100 pro Brunnen 3 min bei RT permeabilisiert und erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden nun mit 100 µl 0,5 % (m/v) fettsäurefreiem Rinderserumalbumin (BSA) in PBS⁺⁺ für 45 min bei RT abgesättigt. Daraufhin folgte eine Inkubation für 60 min mit einem Anti-c-Myc-Antikörper [0,025 µg/ml in 0,5 % (m/v) BSA in PBS⁺⁺; 100 µl pro Brunnen]. Anschließend wurde dreimal 5 min mit PBS⁺⁺ gewaschen, bevor die Zellen mit dem zweiten Antikörper, einem Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat aus Ziege (Verdünnung 1:100), und 25 µg/ml TRITC-Phalloidin in 10 µl PBS⁺⁺ mit 0,5 % (m/v) BSA für 60 min im Dunkeln inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ für je 5 min wurde das *Culture Slide* zur Ablösung der Plastikwände vom Objektträger für 10 min in Ethanol gestellt. Der Objektträger wurde mit 100 µl Mowiol-Lösung benetzt und mit einem großen Deckgläschen eingedeckelt. Mit einem Mikroskop Axiovert S100 der Fa. Zeiss wurden die Zellen untersucht und die Ergebnisse photographisch dokumentiert.

PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺): 148 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
0,9 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂
pH 7,2

2.2.12 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine entsprechende Proteinmenge der zu untersuchenden Proben in Plastik-Einmalküvetten mit Aqua bidest. auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und gemischt. Als Vergleich diente eine Standardreihe mit 0-20 µg Rinder-γ-Globulin. Nach 10 min wurde die Extinktion durch VIS-Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Leerwert diente die Absorption der Standardlösung mit 0 µg Rinder-γ-Globulin. Mit Hilfe der Standardreihe wurde der Proteingehalt der Proben berechnet.

Bradford-Reagenz: 350 mg Serva-Blue G
250 ml Ethanol
250 ml Phosphorsäure (85 %)
Aqua bidest. ad 1000 ml

2.2.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid wurden für die Gele im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt. Als Katalysator und Starter für die Kettenreaktion dienten Lösungen von TEMED bzw. APS. Das Sammelgel bestand konstant aus 6 % (m/v) Acrylamid. Es wurden 9 cm lange Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von meist 10 % (m/v) eingesetzt. Der Molekulargewichtsstandard bestand aus BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitor (20,1 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa) bzw. Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), BSA, Ovalbumin und Carboanhydrase. Die Elektrophorese wurde bei 36 mA pro Gel für etwa 4 h durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine entweder auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen oder mit Färbelösung gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit Entfärbelösung ausgewaschen.

APS-Lösung: 10 % (m/v) APS in Aqua bidest.

TEMED-Lösung: 840 µl TEMED
Aqua bidest. ad 10 ml

Trenngel-Puffer (2x): 750 mM Tris-HCl
0,2 % (m/v) SDS
pH 8,8

Sammelgel-Puffer (2x): 250 mM Tris-HCl
0,2 % (m/v) SDS
pH 6,8

Laemmli-Puffer (3x): 220 mM Tris-HCl
6,6 % (m/v) SDS
20 % (v/v) β -Mercaptoethanol
33 % (v/v) Glycerol
0,1 % (m/v) Bromphenolblau
pH 7,5

Laufpuffer (10x): 25 mM Tris-HCl
200 mM Glycin
1 % (m/v) SDS

Färbelösung: 0,7 g Coomassie Blue R
250 ml Methanol
50 ml Essigsäure
ad 500 ml Aqua bidest.

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Methanol

2.2.14 Westernblot-Analyse

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit einer Gesamtladungsmenge von 2000 mAh bei 4°C auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dieser Transfer erfolgte in einer mit Blotpuffer gefüllten Kammer. Um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu kontrollieren, wurden die Proteine mit 0,1

% (m/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure gefärbt und die überschüssige Farbe mit Wasser ausgewaschen. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h mit 5 % (m/v) BSA in TBS-Lösung blockiert und anschließend einmal mit TBS-Lösung gespült. Für die folgende, einstündige Inkubation mit dem Maus-Anti-c-Myc-Antikörper wurde eine 1:1000-Verdünnung in TBS mit 0,1 % (m/v) BSA verwendet. Nach viermaligem Waschen für 5 min in TBS mit 0,2 % (v/v) Tween 20 wurde die Membran erneut mit der BSA-Lösung für 10 min inkubiert. Dann wurde der Blot für 1 h mit einem Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege [Verdünnung 1:5000 in TBS mit 0,1 % (m/v) BSA] inkubiert, bevor wiederum dreimal in TBS mit 0,2 % (v/v) Tween 20 und einmal in TBS ohne Tween 20 gewaschen wurde. Die gebundenen Antikörper wurden durch "enhanced chemiluminescence" (ECL, Mischung von gleichen Vol. ECL-Reagenz 1 und 2) nach Inkubation für 1 min mit Expositionszeiten von 0,5-10 min detektiert.

Blotpuffer: 40 mM Tris-HCl
300 mM Glycin
0,01 % (m/v) SDS
20 % (v/v) Methanol

TBS (20x): 3 M NaCl
200 mM Tris-HCl
pH 7,4

2.2.15 Proteingewinnung aus Sf9-Insektenzellen

2.2.15.1 Kotransfektion von Sf9-Zellen und Virusamplifikation

Zur heterologen Expression von Proteinen in Sf9-Zellen wurde die für das Protein kodierende cDNA in den Baculovirus-Transfervektor pAcGHLT kloniert. Die Kotransfektion von Sf9-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA in pAcGHLT und BaculoGold-DNA (PharMingen), die allein nicht für ein vollständiges Baculovirus kodiert, führt durch genetische Rekombination zu einem Virusgenom, welches einen lebensfähigen Virus kodiert. Dieses Virus besitzt die Fähigkeit große Mengen des gewünschten Protein nach Infektion von Sf9-Zellen zu produzieren. Hierzu wurden 3×10^6 Sf9-Zellen in einer 75 cm^3 -

Zellkulturflasche ausgesät. Zwanzig μg der Plasmid-DNA wurden mit Wasser auf 200 μl aufgefüllt, mit 50 μl 3 M Natriumacetat-Lösung vermischt. Durch die Zugabe von 625 μl Ethanol wurde die DNA ausgefällt, und anschließend mit 500 μl 70 % (v/v) Ethanol einmal gewaschen und dann in 20 μl sterilem Wasser resuspendiert. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1 μg der Plasmid-DNA und 0,25 μg BaculoGold-DNA mit 100 μl TNM-Medium gemischt. In einem weiteren Eppendorf-Gefäß wurden 10 μl Lipofektin mit 100 μl TNM-Medium zusammengegeben. Beide Ansätze wurden zusammengegeben und gemischt, 15 Minuten bei RT inkubiert, anschließend mit 2 ml TNM-Medium gemischt und auf die inzwischen adhärenen Sf9-Zellen gegeben, die zuvor einmal mit TNM-Medium gewaschen wurden. Es folgte eine Inkubation bei 27°C für 18 h. Danach wurde das Medium abgesaugt und 5 ml frisches TNM-Medium mit 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin wurden zu den Zellen gegeben. Schließlich wurde fünf Tage bei 27°C inkubiert, bevor der Überstand der Zellen abgenommen und 10 min bei 2.000 U/min und RT abzentrifugiert, ehe die erhaltene Viruslösung in ein neues Röhrchen überführt wurde.

Für die zweite Virusamplifikation wurden 5×10^6 Sf9-Zellen in eine 175 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät und drei bis vier Stunden bei 27°C inkubiert. Nach dem Absaugen des Wachstumsmedium wurden 3 ml der Viruslösung der ersten Amplifikation sowie 3 ml frisches TNM-Medium auf die adhärenen Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei RT, wobei die Flasche alle 10 min leicht geschwenkt wurde. Anschließend wurden 24 ml frisches TNM-Medium mit FKS und Penicillin/Streptomycin auf die Zellen gegeben und diese bei 27°C für fünf Tage inkubiert. Man erhielt damit im Überstand die sogenannte zweite Virusamplifikation. Für die dritte Virusamplifikation wurde analog der zweiten verfahren, wobei die Zellen mit 3 ml der zweiten Viruslösung infiziert wurden. Durch die dritte Virusamplifikation erhielt man eine Viruslösung mit ausreichend hohem Titer zur Infektion einer großen Zahl von Sf9-Zellen für die Aufreinigung des gewünschten Proteins.

2.2.15.2 Proteinaufreinigung aus Sf9-Zellen

Zur Proteinaufreinigung wurden 15-20 Zellkulturschalen (\varnothing 145 mm) mit konfluenten Sf9-Zellen angezüchtet. Das Medium wurde abgesaugt, und 2-5 ml Viruslösung

der dritten Amplifikation wurden auf jede Schale gegeben. Während der folgenden einstündigen Inkubation bei 27°C wurden die Schalen alle 15 min zur guten Verteilung der Viren geschwenkt. Danach wurden 15-18 ml TNM-Medium mit Serum und Penicillin/Streptomycin auf jede Schale gegeben und die Zellen 3 Tage bei 27°C inkubiert.

Die Aufreinigung der gewünschten rekombinanten Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie der mit einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsanteil exprimierten Proteine an Glutathion-Sepharose. Die infizierten Sf9-Zellen wurden dazu durch mehrfaches Aufpipettieren von Wachstumsmedium von den Zellschalen abgespült und in sterilen 50 ml-Röhrchen gesammelt. Dann wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 1.500 U/min und RT während 15 min sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.0 R), danach in 50 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und in 5 ml TEgD-Puffer/0,25 M Saccharose aufgenommen. Um die Zellen zu lysieren, wurden sie 4 x 30 s mit Ultraschall auf Eis sonifiziert, und anschließend wurde das Zellysate bei 20.000 U/min und 4°C für eine Stunde zentrifugiert (Sorvall RC-5B). Währenddessen wurden 0,5 ml Glutathion-Sepharose-"Beads" in eine Säule gefüllt und bei 4°C mit 7,5 ml TEgD-Puffer äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde dreimal über die Säule mit den Glutathion-Sepharose-"Beads" gegeben, wonach die "Beads" mit den gebundenen Proteinen mit 5 ml TEgD-Puffer gewaschen wurden. Schließlich wurden die Proteine in 2,5 ml TEgD-Puffer mit 10 mM Glutathion von den "Beads" eluiert, oder die "Beads" mit den gebundenen Proteinen wurden in einer geeigneten Menge TEgD-Puffer aufgenommen. Von der Proteinlösung oder "Beads"-Suspension wurde eine entsprechende Menge für eine Proteinbestimmung abgenommen, der Rest in Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C bzw. bei 4°C gelagert.

TEgD/0,25 M Saccharose: 50 mM Tris-HCl
2 mM EGTA
1 mM DTT
10 μM PMSF
1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
0,25 M Saccharose
pH 7,5

TEgD: 50 mM Tris-HCl
2 mM EGTA
1 mM DTT
pH 7,5

TEGD/10 mM Glutathion: 50 mM Tris-HCl
2 mM EGTA
1 mM DTT
10 mM Glutathion
pH 7,5

2.2.16 Gewinnung von rekombinantem RhoA, Rac1 und Cdc42 aus *Escherichia coli*

Zur Aufreinigung der rekombinanten Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 wurden pGEX-Vektoren verwendet, die für die entsprechenden Proteine zusammen mit einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsanteil kodieren. Es wurden jeweils 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin unter sterilen Bedingungen mit Bakterien aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht im Warmluftschüttler (180 U/min, 37°C) inkubiert. Die Bakterien der Übernacht-Kulturen wurden dann bei 4.000 U/min für 10 min bei RT sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.0 R), anschließend in je 5 ml frischem LB-Medium mit Ampicillin resuspendiert, und schließlich wurden hiermit jeweils 2 l LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Es folgte eine Inkubation für 1,5 h im Warmluftschüttler bei 180 U/min und 37°C. Durch Zugabe von final 0,1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert, und die Bakterienkulturen wurden für weitere 3 h wie oben inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (Sorvall RC-5B, 6.000 U/min, 4°C, 15 min), die Bakterien-Pellets wurden in je 3 ml kaltem Lysis-Puffer resuspendiert und durch Sonifizieren mit Ultraschall (3 x 1 min) auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bei 20.000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Währenddessen wurden 0,5 ml Glutathion-Sepharose-"Beads" in eine Säule gefüllt und bei 4°C mit 5 ml Lysis-Puffer äquilibriert bevor der Überstand der Zentrifugation dreimal über die Säule mit den Glutathion-Sepharose-"Beads" gegeben wurde. Dann wurden die "Beads" mit 5 ml Wasch-Puffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Schließlich wurden die Proteine in einer geeigneten Menge Lysis-Puffer mit 5 mM Glutathion von den "Beads" eluiert, oder die "Beads" mit den gebundenen Proteinen wurden in 1 ml Wasch-Puffer resuspendiert. Von der Proteinlösung oder "Beads"-Suspension wurde eine entsprechende Menge für eine Proteinbestimmung abgenommen, der Rest in Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C bzw. bei 4°C gelagert.

Lysis-Puffer I: 50 mM Tris-HCl
50 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM PMSF
pH 7,6

Wasch-Puffer: 20 mM Tris-HCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
20 % (v/v) Glycerol
2,5 µM GDP
pH 7,6

2.2.17 Messung des Guaninnukleotid-Austauschs von Rho-GTPasen

Zur Bestimmung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität eines (potentiellen) GEFs diene folgender *in vitro*-Versuch. Die aus *E. coli* aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteine von RhoA, Rac1 und Cdc42 mit Glutathion-S-Transferase wurden zunächst durch Inkubation für 5 min bei RT in Beladungspuffer mit 3 µM [³H]GDP und 2 mM EDTA Nukleotid-frei gemacht, bevor die Ansätze auf 5 mM MgCl₂ eingestellt wurden und die Beladung der GTPasen mit [³H]GDP für weitere 20 min bei RT erfolgte. Für eine Messung wurde eine entsprechende Menge dieser Ansätze mit der gewünschten Menge des mit Hilfe von rekombinanten Baculoviren aus Sf9-Zellen gewonnenen Austauschfaktors auf 50 µl aufgefüllt, welcher zuvor 15 min lang in Versuchspuffer mit 1 mM GTP äquilibriert worden war. Sofort nach dem Zusammengeben sowie nach den zu untersuchenden Zeitintervallen wurde viermal eine Probe von je 10 µl in 500 µl Waschpuffer überführt und mittels Vakuumpumpe durch einen Nitrocellulosefilter (0,45 µm Porengröße) filtriert. Ungebundenes [³H]GDP wurde so abgetrennt, wohingegen noch Protein-gebundenes [³H]GDP auf den Filtern zurückblieb. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne GEF. Anschließend wurden die Filter zweimal mit je 3 ml Waschpuffer gewaschen, dann während 1 h in je 1 ml Ethylenglykolmonomethylether aufgelöst und schließlich mit jeweils 3,5 ml Szintillationslösung versetzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch

Flüssigkeitsszintillationszählung (Zählgerät Beckman LS 6000 SC). Zur Messung der Bindung von GTP γ S wurde bei der Beladung der GTPasen unmarkiertes GDP (10 μ M) anstatt [3 H]GDP eingesetzt und der Austauschpuffer enthielt 5 μ M [35 S]GTP γ S anstelle von unmarkiertem GTP.

Beladungspuffer: 20 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
2 mM EDTA
0,1 mM DTT
0,1 mM APP-PNP
3 μ M [3 H]GDP
pH 7,5

Versuchspuffer: 20 mM Tris-HCl
80 mM NaCl
5 mM MgCl₂
0,1 mM DTT
1 mM APP-PNP
0,4 mg/ml BSA
1 mM GTP
pH 7,5

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl
80 mM NaCl
10 mM MgCl₂
7 mM β -Mercaptoethanol
pH 7,5

2.2.18 Untersuchung der Interaktion von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren mit Rho-GTPasen bzw. von N- und C-Terminus von KIAA0337

Um die Interaktion von GEFs mit Rho-Proteinen zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen wie unter 2.2.10 beschrieben mit der für den entsprechenden Austauschfaktor kodierenden Plasmid-DNA transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen durch mehrfaches Aufpipettieren von Wachstumsmedium von der Zellschale abgespült. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, 1.500 U/min, 15 min, RT), danach in 10 ml PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und in 3 ml Lyse-Puffer aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation bei 3.500 U/min für 4 min bei RT (Heraeus

Megafuge 1.0 R), woraufhin jeweils 200 µl des erhaltenen Überstandes (~1 mg Protein) mit 300 µl Puffer A, B bzw. C für 2,5 h bei 4°C inkubiert wurden. Währenddessen wurden jeweils 450 µg der an Glutathion-Sepharose-"Beads" gebundenen rekombinanten Rho-GTPasen mit dem Zellysat untransfizierter Zellen (~700 µg Protein) für 1 h bei 4°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Dann wurden die "Beads" durch Zentrifugation sedimentiert (Heraeus Biofuge 13, 3.000 U/min, 2 min, RT), der Überstand wurde verworfen, und die "Beads" wurden in je 1,5 ml Puffer A für 1 h bei RT inkubiert, um die Rho-GTPasen in einen Nukleotid-freien Zustand zu überführen. Nach Resuspension der "Beads" wurde jeder Ansatz in 3 Aliquots à 500 µl aufgeteilt und zur Generierung des Nukleotid-freien, GDP-gebundenen und GTP-gebundenen Zustands wurden die Aliquots der "Beads" mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen der Rho-GTPasen nach erneuter Zentrifugation (wie oben) in jeweils 1,5 ml Puffer A, B bzw. C für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die "Beads" wiederum sedimentiert, bevor sie mit den entsprechenden Lysaten der transfizierten Zellen für 48 h bei 4°C inkubiert wurden. Schließlich wurden die "Beads" durch Zentrifugation (wie zuvor) sedimentiert, dreimal mit je 500 µl Puffer A, B bzw. C gewaschen und in 60 µl 1x Laemmli-Puffer resuspendiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran überführt und eine Westernblot-Analyse wie unter 2.2.14 beschrieben unter Verwendung eines Maus-Anti-c-Myc-Antikörpers durchgeführt. Die Detektion der immunoreaktiven Proteine erfolgte durch "enhanced chemiluminescence".

Bei der Untersuchung der Interaktion des N- und C-Terminus von KIAA0337 wurde der mit GST fusionierte N-Terminus KIAA0337-ΔC mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in Sf9-Insektenzellen exprimiert und an Glutathion-Sepharose-"Beads" gebunden (siehe 2.2.15). Abschließend wurden jeweils 250 µg dieser Beads nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit dem Lysat von HEK293-Zellen (~4 mg Protein), welche das c-Myc-markierte Epitop des C-Terminus ohne DH-Domäne KIAA0337-ΔN2 exprimierten, für 48 h bei 4°C inkubiert. Im Unterschied zu obiger Versuchsbeschreibung wurde der Inkubationsansatz zusätzlich auf 5 mM MgCl₂ und 3 % Glycerol eingestellt und die "Beads" wurden nach erfolgter Inkubationszeit dreimal mit Lyse-Puffer II gewaschen

Lyse-Puffer II: 20 mM Tris-HCl
100 mM NaCl

2 mM EDTA
0,5 % (v/v) Triton X-100
0,2 % (m/v) Natrium-Deoxycholat
1 mM DTT
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
pH 7,6

Puffer A: 20 mM Tris-HCl
50 mM NaCl
10 mM EDTA
0,1 % (v/v) Triton X-100
5 % (v/v) Glycerol
1 mM DTT
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
pH 7,6

Puffer B: Puffer A
ohne 10 mM EDTA
10 mM MgCl₂
120 µM GDP

Puffer C: Puffer B
ohne 120 µM GDP
120 µM GTPγS

2.2.19 Untersuchung der "Serum response factor"-abhängigen Aktivierung der Gentranskription

Die Rho-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors "Serum response factor" (SRF), welcher die Promotor-Regulatorsequenz "Serum response element" (SRE) aktiviert und damit die Transkription von Genen stimuliert, wurde mit Hilfe des "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Fa. Promega) untersucht. Dabei diente die Bildung des Enzyms Luciferase als Maß für die Induktion der von "Serum response factor" abhängigen

Gentranskription. Für die folgenden Untersuchungen wurden HEK293-Zellen auf 12-Loch-Platten gesplittet. Dann wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge der verschiedenen Expressionsplasmide sowie dem Reporter-Plasmid pSRE.L und dem Kontroll-Reporter pRL-TK kotransfiziert. Zur Reinigung der DNA wurde zunächst von jedem Plasmid die benötigte DNA-Menge (meist 20-100 µg) mit Ethanol gefällt und anschließend in sterilem Wasser aufgenommen, so daß sich eine Endkonzentration von 0,1 µg/µl ergab. Pro Brunnen wurden nun insgesamt 3 µg DNA zur Transfektion verwendet, wobei in allen Versuchen jeweils 0,1 µg des Kontroll-Reporters pRL-TK und 0,5 µg des Reporter-Plasmids pSRE.L eingesetzt wurde und den DNA-Mischungen zum Erreichen der DNA-Gesamtmenge leerer Expressionsvektor zugesetzt wurde. Die jeweilige DNA-Mischung wurde mit sterilem Wasser auf 70 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 30 µl 2 M CaCl₂ und 100 µl 2-fach HeBS-Puffer präzipitiert (siehe 2.2.10). Währenddessen wurden pro Brunnen 10 µl einer 10 mM Chloroquin-Lösung auf die Zellen gegeben, bevor die jeweilige Mischung der verschiedenen Präzipitate auf die Brunnen verteilt wurde. Nach einer Inkubation für 4 h im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen einmal mit Wachstumsmedium gewaschen und die Transfektion durch Zugabe von 1 ml Serum-entzogenem Medium mit 0.5 % (v/v) FKS abgestoppt, wobei dem Medium gegebenenfalls ein Rezeptoragonist (LPA oder Carbachol) zugesetzt wurde. Dann wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag zunächst mit 500 µl PBS⁺⁺ pro Brunnen gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden pro Brunnen 250 µl 1x PLB-Puffer (Fa. Promega) auf die Zellen gegeben, dann wurden die 12-Loch-Platten 15 min bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Bildung des Reporterenzym Luciferase wurde auf der Basis zweier Chemolumineszenz-Reaktionen mit Hilfe des "Dual-Luciferase Reporter Assay System" der Fa. Promega nach den Angaben des Herstellers bestimmt, wobei in der Regel 5 µl einer 1:100-Verdünnung des jeweiligen Lysates zur Messung eingesetzt wurden (Lumat, Fa. Berthold). Zur Vermeidung experimenteller Schwankungen wurde die Aktivität der vom Reporterplasmid pSRE.L gebildeten Luciferase auf die Aktivität des Kontroll-Reporters pRL-TK (Messung der Bildung einer zweiten Luciferase) bezogen. Die Bildung des Reporters Luciferase wurde hierbei als Vielfaches der Luciferase-Bildung in Kontroll-Zellen bestimmt, die nur mit dem Reporter-Konstrukt transfiziert worden waren und nicht stimuliert wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von p114-Rho-GEF, ein neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktor für die GTPase RhoA

Auf der Suche nach neuen Rho-GEFs der Dbl-Familie durchsuchten wir verschiedene DNA- und Protein-Datenbanken mit der Sequenz der "Dbl homology"-Domäne mehrerer bereits bekannter RhoGEFs, die notwendig und hinreichend für die katalytische Aktivität aller Austauschfaktoren ist, auf mögliche interessante Einträge. Unter den hierbei identifizierten Proteinen mit Homologien zur DH-Domäne interessierte uns zunächst besonders ein bisher nicht charakterisiertes Protein mit der Bezeichnung KIAA0521 (GenBank® accession number AB011093). Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob auch KIAA0521 ein funktionelles Rho-GEF ist. Für KIAA0521 kodierende cDNA wurde uns vom japanischen Kazusa-DNA-Forschungsinstitut in Chiba zur Verfügung gestellt, welches diese cDNA im Juni 1997 auf der Suche nach neuen cDNA-Sequenzen im Gehirn exprimierter, menschlicher Gene isoliert hatte (Nagase *et al.*, 1997).

Die Untersuchung der Sequenz von 5113 Basenpaaren auf offene Leserahmen zeigte einen potentiell kodierenden Bereich ab einem Basentriplett ATG an Position 108 bis zu Nukleotid 3153. Obwohl man vor dem ersten für Methionin kodierenden Triplett zum 5'-Ende hin kein Stop-Codon im Leserahmen findet, lassen folgende Befunde dennoch auf die Vollständigkeit der cDNA und der von ihr abgeleiteten Proteinsequenz schließen: Die Sequenz um das Start-Codon ist mit einem Purin (G) an der Stelle -3 in recht guter Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz nach Kozak für die Initiation der Translation (Kozak *et al.*, 1991). Zudem ist die weiter aufwärts gelegene Sequenz sehr GC-reich (> 75 %) und folglich sehr wahrscheinlich nicht kodierend. Unter der Annahme, daß die Translation bei Nukleotid 108 startet, kodiert die cDNA von KIAA0521 für ein Protein aus 1015 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 114 kDa, weshalb wir das neue potentielle Rho-GEF "p114-Rho-GEF" genannt haben (Abb. 2A).

Weitere Untersuchungen der Sequenz von p114-Rho-GEF auf bekannte Struktur motive ergaben, daß das Protein wie alle Rho-GEFs neben der typischen DH-Domäne zwischen den Aminosäuren 103 und 299 eine C-terminal benachbarte PH-Domäne zwischen

den Aminosäuren 336 und 439 und zusätzlich eine Prolin-reiche Region im hinteren Molekülteil zwischen den Aminosäuren 954 und 969 besitzt. Innerhalb der DH-Domäne weist p114-Rho-GEF mit 61 %, 54 % bzw. 51 % Identität und 75 %, 75 % bzw. 72 % Ähnlichkeit die größten Homologien zu den Austauschfaktoren p190 RhoGEF, Lbc und Lfc auf (Abb. 2C). Die größten Homologien innerhalb der PH-Domäne weist p114-Rho-GEF ebenfalls zu den Rho-GEFs p190, Lbc und Lfc mit 74 %, 57 % bzw. 57 % Identität und 85 %, 77 % bzw. 77 % Ähnlichkeit auf (Abb. 2D). Daher scheinen die DH- und PH-Domänen von p114-Rho-GEF die größten Homologien zu Rho-spezifischen GEFs zu besitzen, während sie geringere Ähnlichkeiten zu den (zusätzlich) auf Rac und/oder Cdc42 wirkenden Rho-GEFs wie Dbp, Tiam1 oder Ost aufweisen (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der Proteine ganzer Länge zeigte p114-Rho-GEF mit 44 % Identität und 59% Ähnlichkeit die größte Homologie zu p190 RhoGEF. Nur sehr geringe Homologien wies p114-Rho-GEF zu p115 RhoGEF, einem anderen Rho-spezifischen GEF, auf, obwohl beide Proteine eine sehr ähnliche molekulare Masse besitzen.

Die Expression von p114-Rho-GEF in verschiedenen humanen Geweben wurde mit Hilfe eines Northern Blots untersucht. Dabei konnte ein Transkript von etwa 6,4 kb Länge in allen untersuchten Geweben und zwar mit der höchsten Expression in Niere und Pankreas und mit geringerer Intensität in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber und Skelettmuskel nachgewiesen werden. Zusätzlich trat im Skelettmuskel ein kürzeres Transkript von ca. 3,9 kb Länge auf, was auf die Expression einer Spleißvariante von p114-Rho-GEF in diesem Gewebe hindeutet (Abb. 3).

Um zu prüfen, ob p114-Rho-GEF in den von uns verwendeten HEK293- und J82-Zellen endogen exprimiert wird, wurde mit Erststrang-cDNA aus HEK293- und J82-Zellen und mit für die Sequenz von p114-Rho-GEF spezifischen Oligonukleotiden eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde zudem eine PCR mit der zur cDNA-Synthese verwendeten Gesamt-RNA aus HEK293- und J82-Zellen ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt. Als Negativkontrolle diente Wasser, für p114-Rho-GEF kodierende Plasmid-DNA diente als Positivkontrolle. Nur mit der Erststrang-cDNA von HEK293- und J82-Zellen konnte das erwartete PCR-Produkt nachgewiesen werden, nicht mit der RNA ohne reverse Transkription, was für die Expression von p114-Rho-GEF in diesen Zelllinien spricht (Abb. 4).

Zur raschen und direkten funktionellen Untersuchung der Aktivität und Spezifität des Proteins in intakten Zellen wurde sowohl die cDNA des Proteins ganzer Länge, p114-Rho-GEF, als auch die cDNA für ein in der DH-Domäne deletiertes Konstrukt, p114-ΔDH, in einen eukaryonten Expressionsvektor umkloniert (Abb. 2A). Hierzu wurde der Vektor pCMV-Tag3 (Fa. Stratagene) verwendet, um die Proteine mit einem c-Myc-Epitop fusioniert exprimieren und mit einem Anti-c-Myc-Antikörper nachweisen zu können. Für die Klonierung der Volllänge von p114-Rho-GEF wurde die ursprüngliche cDNA als *SmaI/SmaI*-Fragment (bp 57-3795) in den mit *EcoRV* linearisierten Vektor pCMV-Tag3C umkloniert. Dieses Konstrukt wurde dann weiter zur Klonierung von p114-ΔDH verwendet, wobei die cDNA durch Schneiden mit *XagI* in der DH-Domäne deletiert (bp 301-947), die Schnittstellen mit Klenow-DNA-Polymerase I aufgefüllt und der Vektor anschließend wieder religiert wurde. Diese Mutante p114-ΔDH sollte katalytisch inaktiv sein und sich möglicherweise dominant negativ verhalten.

Die Expression der so erhaltenen Konstrukte von p114-Rho-GEF in den für die folgenden Untersuchungen transfizierten HEK293- oder J82-Zellen konnte nach Auftrennung der entsprechenden Lysate durch SDS-PAGE im hier für alle Experimente beispielhaft gezeigten Westernblot mit Hilfe eines Anti-c-myc-Antikörpers nachgewiesen werden, wobei die Größen der detektierten Proteine in guter Übereinstimmung mit den zuvor berechneten molekularen Massen waren (Abb. 2B).

Da bekannt war, daß kleine GTPasen der Rho-Familie in Fibroblasten typische Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts hervorrufen, sollte nun zuerst untersucht werden, ob p114-Rho-GEF in intakten Zellen als GEF für Rho-GTPasen wirkt und welchen Effekt die Überexpression von p114-Rho-GEF auf die Organisation des Aktin-Cytoskeletts von J82-Zellen, eine humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie, hat. Kontroll-Experimente mit konstitutiv aktiven Mutanten verschiedener Rho-GTPasen zeigten, das die Expression von V14 RhoA in J82-Zellen zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern führte, während sich bei Expression von V12 Rac1 Lamellipodien ausbildeten (Koch *et al.*, 1999). Für den folgenden Versuch wurden nun J82-Zellen mit Plasmid-DNA für das mit einem c-Myc-Epitop fusionierte p114-Rho-GEF transfiziert und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Die Darstellung des Aktin-Cytoskelett erfolgte durch Anfärbung mit TRITC-Phalloidin, die transfizierten Zellen wurden durch die Fluoreszenz des FITC-markierten Anti-c-Myc Antikörpers identifiziert. Es kam bei

Überexpression von p114-Rho-GEF zu einer Ausbildung von Aktin-Streßfasern, wie sie für aktiviertes RhoA typisch ist, im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen, die keine Veränderung des Aktin-Cytoskeletts aufwiesen (Abb. 5). Dieser Befund legte nahe, daß p114-Rho-GEF *in vivo* in der Lage ist, endogenes RhoA zu aktivieren.

Zur Gewinnung des Proteins von p114-Rho-GEF wurde dieses mit Hilfe rekombinanter Baculoviren als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in Sf9-Insektenzellen exprimiert und aus diesen aufgereinigt, um in einem *in vitro*-Versuch die potentielle katalytische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von p114-Rho-GEF an Rho-GTPasen zu untersuchen. Dazu wurde die für p114-Rho-GEF kodierende cDNA mit *EcoRI* und *HindIII* aus dem Konstrukt im pCMV-Tag3-Vektor ausgeschnitten, das überhängende *HindIII*-Ende mit Klenow-DNA-Polymerase I aufgefüllt und in den mit *EcoRI* und *SmaI* linearisierten Baculovirus-Transfervektor pAcGHLT-B umkloniert, welcher die Expression von p114-Rho-GEF mit einem N-terminal fusionierten GST-Anteil erlaubt. Durch Kotransfektion eines der isolierten Klone mit BaculoGold-DNA (Fa. PharMingen) in Sf9-Zellen wurde das rekombinante, für p114-Rho-GEF kodierende Baculovirus komplettiert und anschließend amplifiziert. Nach Infektion einer großen Kultur von Sf9-Zellen wurde das mit GST fusionierte Protein von p114-Rho-GEF mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose aus den Zellen aufgereinigt. Nach anschließender SDS-PAGE und Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau, konnte eine weitgehend homogene Proteinbande beim erwarteten Molekulargewicht von etwa 150 kDa (entspricht ~ 114 kDa für das p114-Rho-GEF + ~ 30 kDa GST) nachgewiesen werden (Abb. 6).

Um p114-Rho-GEF bezüglich seiner Guaninnukleotid-Austauschaktivität und seiner Spezifität gegenüber verschiedenen Rho-GTPasen *in vitro* funktionell zu charakterisieren, wurden aus *E. coli* aufgereinigte rekombinante Fusionsproteine, GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42, zunächst mit [³H]GDP beladen. Anschließend wurden sie in GTP-haltigem Puffer ohne oder mit dem rekombinanten, gereinigten Protein GST-p114-Rho-GEF für 40 min inkubiert. Bei einer katalytischen Aktivität des Proteins sollte seine Zugabe zu einem Austausch des radioaktiven [³H]GDP gegen nicht radioaktives GTP führen, wodurch sich die Menge an Protein-gebundenem [³H]GDP verringern sollte. Wie Abb. 7A zeigt, wurde durch p114-Rho-GEF das gebundene [³H]GDP massiv (zu etwa 70 %) aus RhoA freigesetzt (Vergleich zur [³H]GDP-Freisetzung in Abwesenheit von p114-Rho-GEF), während auf die

Freisetzung von [^3H]GDP aus Rac1 und Cdc42 kein Effekt zu beobachten war. Weitere Untersuchungen zeigten, daß p114-Rho-GEF konzentrationsabhängig die Freisetzung des gebundenen [^3H]GDP aus RhoA stimulierte, und es sich hierbei um eine katalytische Reaktion handelt, da bei diesen Versuchen p114-Rho-GEF im Vergleich zu RhoA in subäquimolaren Mengen eingesetzt wurde. Die halbmaximale Freisetzungsrates von [^3H]GDP aus RhoA (0,6 μM) wurde bei einer Konzentration von 0,06 μM p114-Rho-GEF beobachtet, maximale Effekte traten bei Konzentrationen $\geq 0.1 \mu\text{M}$ auf (Abb. 7B).

Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Freisetzung von [^3H]GDP aus RhoA zeigten, daß p114-Rho-GEF die eigentlich langsame GDP-Freisetzung deutlich beschleunigt (Abb. 8A). Umgekehrt wurde schließlich die Bindung des stabilen GTP-Analogons [^{35}S]GTP γS an RhoA unter dem Einfluß von p114-Rho-GEF untersucht, wobei p114-Rho-GEF die [^{35}S]GTP γS -Bindung an RhoA im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls deutlich stimulierte (Abb. 8B). Auch *in vitro* verhielt sich p114-Rho-GEF somit als spezifisches GEF für RhoA.

Bei den Rho-GEFs scheint es bei der Interaktion mit kleinen GTPasen unterschiedliche Spezifitäten bezüglich des Zustands an gebundenem Nukleotid zu geben. Zudem wurde für einige Austauschfaktoren auch eine Interaktion mit Rho GTPasen nachgewiesen, an denen durch das entsprechende GEF kein Nukleotidaustausch katalysiert wird. Um nun die Interaktion von p114-Rho-GEF mit Rho-Proteinen *in vitro* zu untersuchen, wurden RhoA, Rac1 und Cdc42 als GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-"Beads" gebunden, und mit Lysat von HEK293 Zellen inkubiert, die mit c-Myc fusioniertes p114-Rho-GEF exprimierten. Zur Nachahmung der verschiedenen Zustände an gebundenem Nukleotid wurden die Rho-GTPasen zuvor durch entsprechende Vorbehandlungen in den Nukleotid-freien, GDP-gebundenen oder GTP γS -gebundenen Zustand gebracht. Im Western Blot konnte keine Bindung von p114-Rho-GEF an Rac1 und Cdc42 beobachtet werden, unabhängig vom gebundenen Nukleotid. p114-Rho-GEF interagiert jedoch mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA, in Übereinstimmung mit der Theorie, daß p114-Rho-GEF als Austauschfaktor den Nukleotid-freien Zustand der GTPase stabilisieren sollte. Die höchste Bindung zeigte p114-Rho-GEF an RhoA/GTP γS (Abb. 9).

Da die Rho-Proteine Rho, Rac und Cdc42 an der Regulation der Gentranskription beteiligt sind, wobei sie zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors "Serum response

factor" (SRF) führen, welcher dann die Promotor-Regulatorsequenz "Serum response element" (SRE) aktiviert, wurde schließlich untersucht, ob p114-Rho-GEF in der Lage ist, die Gentranskription über SRF und SRE *in vivo* zu stimulieren und welche Rho-GTPase an dieser potentiellen Aktivierung beteiligt ist. Für unsere Versuche verwendeten wir einen Expressionsvektor für die klassische Form des Enzyms "Luciferase" aus dem Leuchtkäfer, welcher durch einen Promotor mit SRE.L kontrolliert wird, eine von *c-fos* SRE abgeleitete, mutierte Promotor-Sequenz, die zwar noch eine hochaffine Bindungsstelle für SRF besitzt, aber nicht den durch Ras aktivierbaren "Ternary complex factor" (TCF) binden kann. Die Expression von konstitutiv aktivem V14 RhoA in HEK293-Zellen führte ebenso wie die Transfektion mit einer ausreichend hohen Menge an Plasmid-DNA für p114-Rho-GEF zu einer etwa 15- bis 20-fachen Steigerung der Bildung des Reporters Luciferase. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Koexpression von C3-Transferase, welche spezifisch Rho(A-C) ADP-ribosyliert und dadurch inaktiviert, vollständig aufgehoben werden (Abb. 10). Dominant negative Mutanten von Rac1 oder Cdc42 hatten dagegen keinen Einfluß auf den Effekt von p114-Rho-GEF (Daten nicht gezeigt). Daher scheint p114-Rho-GEF Rho-abhängig die Aktivierung der Gentranskription durch SRF zu aktivieren, was ebenso wie die Streßfaserbildung die Vorstellung unterstützt, daß p114-Rho-GEF *in vivo* als Rho-spezifischer Austauschfaktor aktiv ist.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob p114-Rho-GEF an Signaltransduktionswegen G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die zur Aktivierung von Rho führen, beteiligt ist, wurde ebenfalls die SRF- und SRE-abhängige Aktivierung der Gentranskription gemessen. Die Stimulation des endogen in HEK293-Zellen exprimierten LPA-Rezeptors mit 10 μ M LPA führte zu einer etwa 2-fachen Erhöhung der SRF-abhängigen Expression des Reporters Luciferase im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-Zellen (Abb. 11A). Auch die Aktivierung von HEK293-Zellen, die stabil den M₃ mAChR exprimieren, mit Carbachol (1 mM) steigerte die Aktivität der Luciferase auf etwa das 3-fache (Abb. 11B). In den nachfolgenden Versuchen kam es durch Carbachol auch durchaus zu einer 3- bis 10-fachen Erhöhung der Gentranskription. Der stimulierende Effekt dieser beiden Rezeptor-Agonisten wurde durch die Koexpression von C3-Transferase vollständig unterdrückt, wohingegen die Koexpression der dominant negativen Mutanten von Rac1 und Cdc42 keinen hemmenden Einfluß auf die Luciferase-Bildung hatten, was nahelegt, daß die Stimulation durch G-Protein gekoppelte

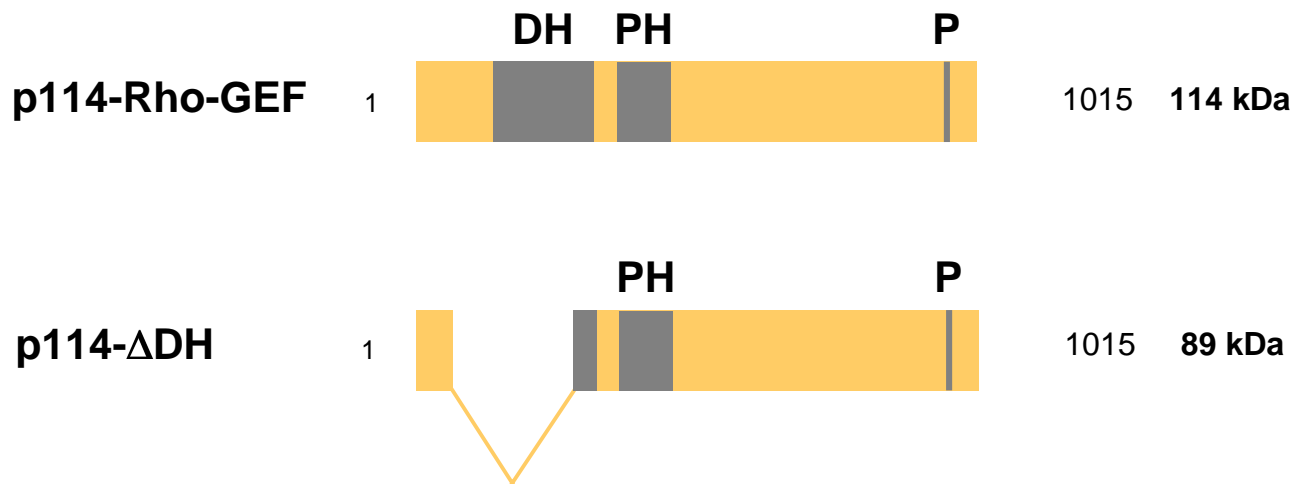
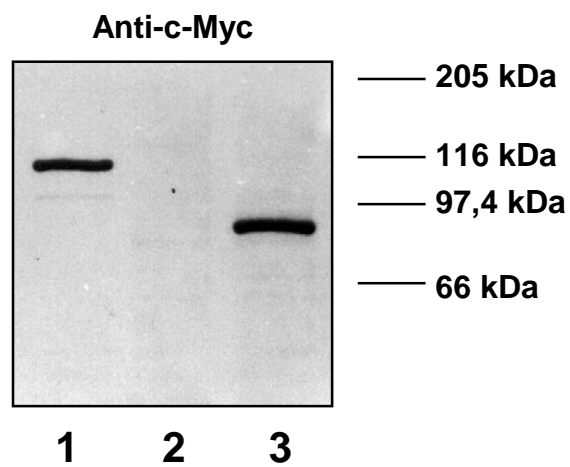
Rezeptoren spezifisch durch Rho(A) vermittelt wird (Daten nicht gezeigt). Wurde p114-Rho-GEF in einer so geringen Menge koexprimiert, daß durch seine Expression allein kaum eine Stimulation der Gentranskription beobachtet werden konnte, so steigerte diese Expression sowohl die durch LPA als auch die durch Carbachol induzierte Bildung des Reporters Luciferase deutlich auf etwa das 5-fache (Abb. 11A und B). Kein potenzierender oder additiver Effekt trat bei Zugabe von LPA oder Carbachol auf, wenn die Expression von p114-Rho-GEF bereits maximal stimulierend war (Daten nicht gezeigt). Wurden HEK293-Zellen mit der Deletionsmutante p114- Δ DH ohne vollständige DH-Domäne kotransfiziert, so war diese Mutante auch bei Expression größerer Mengen *per se* nicht aktiv und sowohl die durch LPA als auch durch Carbachol stimulierte Bildung des Reporters Luciferase wurde um etwa 50 % gehemmt (Abb. 12A und B). Diese Befunde könnten daher für eine Beteiligung von p114-Rho-GEF an der Aktivierung von Rho durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sprechen, obwohl offenbar noch weitere Faktoren bzw. Signalwege bei der GPCR-abhängigen Aktivierung der Gentranskription eine Rolle spielen.

Schließlich untersuchten wir, welche Untereinheiten heterotrimerer G-Protein an der Aktivierung von p114-Rho-GEF durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt sein könnten. Hierzu wurden p114-Rho-GEF und die Deletionsmutante p114- Δ DH zusammen mit den α -Untereinheiten $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ sowie konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ RC) oder die $G\beta\gamma$ -Kombination $\beta_1\gamma_2$ in HEK293-Zellen exprimiert, also Untereinheiten, welche bekanntermaßen zu einer Stimulation dieses Zellsystems führten. Die Expression der Untereinheiten allein stimulierte die Gentranskription zwischen 10- und 25-fach. Die Koexpression von p114-Rho-GEF hatte auf diese Effekte jedoch keinen weiter aktivierenden Einfluß, obwohl die Stimulation der Luciferase-Bildung durch LPA und Carbachol durch die zusätzliche Expression von p114-Rho-GEF deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 13). Wie zuvor bei der Stimulation durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezeigt, so hatte auch hier die Koexpression der Deletionsmutante p114- Δ DH einen hemmenden Einfluß auf die Gentranskription, wobei sowohl die durch alle drei G-Protein- α -Untereinheiten als auch die durch die $\beta_1\gamma_2$ -Untereinheit hervorgerufene Stimulation der Bildung des Reporters Luciferase gehemmt wurde (Abb. 14).

Somit scheint es sich bei p114-Rho-GEF um ein für Rho spezifisches GEF zu handeln, das durch extrazelluläre Signale über G Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert

werden kann, obwohl mit diesem Versuchssystem keine klare Zuordnung zu den an der Stimulation beteiligten G-Protein-Untereinheiten getroffen werden kann.

Abbildung 2: Struktur des Proteins p114-Rho-GEF: Schematische Darstellung der zur Funktionsanalyse exprimierten Proteine und Nachweis im Westernblot; Vergleich der homologen Domänen mit anderen Rho-GEFs der Dbl-Familie. A: Das Protein von p114-Rho-GEF besitzt die für alle Rho-GEFs typischen DH- und PH-Domänen sowie eine prolinreiche Region (P). Zur Funktionsanalyse dienten neben dem Protein ganzer Länge (p114-Rho-GEF) das Konstrukt p114- Δ DH (Deletion: AS 67-281). Angegeben sind jeweils die erste und letzte Aminosäure sowie das berechnete Molekulargewicht. **B:** Zum Nachweis der Expression von p114-Rho-GEF und p114- Δ DH in transfizierten HEK293-Zellen wurden Lysate dieser Zellen (50 μ g Protein) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Hilfe eines Anti-c-Myc-Antikörpers detektiert. **C:** Homologien der DH-Domäne von p114-Rho-GEF (AS 103-299) zu den entsprechenden Sequenzen der Rho-GEFs p190, Lbc und Lfc. Identische bzw. homologe Aminosäuren aus einer der funktionell ähnlichen Gruppen [hydrophobe Reste (I, V, L, M), aromatische Reste (F, W, Y), saure Reste (D, E), basische Reste (K, R), ungeladen-polare Reste (N, Q)] sind schwarz unterlegt dargestellt. **D:** Homologien der PH-Domäne von p114-Rho-GEF (AS 336-439) zu den entsprechenden Sequenzen der Rho-GEFs p190, Lbc und Lfc. Identische bzw. homologe Aminosäuren sind schwarz unterlegt dargestellt.

A**B**

1: p114-Rho-GEF

2: Kontrolle

3: p114- ΔDH

C

DH-Domäne

p114 (Mensch) (103-299)	QDVLYELMQT	EVHHVRTLKI	MLKVYSRALQ	EELQFSSKAI	GRLFPCADDL
p190 (Maus) (848-1042)	QDVIFELMQT	EVHHIQTLTI	MSEVFRKGMK	EELQLDHSTV	DKIFPCLDEL
Lbc (Mensch) (76-272)	QEVIIYELMQT	EFHHVRTLKI	MSGVYSQGMM	ADLLFEQQMV	EKLFPCLDEL
Lfc (Maus) (238-431)	QDVIYELIQT	ELHHVRTLKI	MTRLFRTGML	EELQMEPEVV	QGLFPCVDEL
p114 (Mensch) (103-299)	LETHSHFLAR	LKERRQESLE	EGSDRNYVIQ	KIGDLLVQQF	SGENGERMKE
p190 (Maus) (848-1042)	LETHRHFFFS	MKERRQES-C	AGSDRNFVIN	QIGDILVQQF	SEENASKMKR
Lbc (Mensch) (76-272)	ISIHSQFFQR	ILERKKESLV	DKSEKNFLIK	RIGDVLVNQF	SGENAERLKK
Lfc (Maus) (238-431)	SDIHTRFLNQ	LLERRQALC	PGSTRNFVIH	RLGDLLISQF	SGSNAEQMRK
p114 (Mensch) (103-299)	KYGVFCSGHN	FAVSHYKLLI	QONKKFQNLII	KKIGNFSIVR	RLGVQECILL
p190 (Maus) (848-1042)	IYGEFCSHHK	EAMSLFKE-L	QONKKFQNFII	KIRNSNLIIAR	RRGIPEECILL
Lbc (Mensch) (76-272)	TYGKFCGQHN	QSVNYFKDLIY	AKDKRFQAFV	KKKMSSSVVR	RLGIPEECILL
Lfc (Maus) (238-431)	TYSEFCSRHT	KALKLYKELY	ARDKRFQQFI	RKMTRSAAVLK	RHGVQECILL
p114 (Mensch) (103-299)	VTQRITKYPV	LVERIIQNTI	AGTEDYEDLT	QALNLIKDII	SQVDAKV
p190 (Maus) (848-1042)	VTQRITKYPV	LVERILQYTK	ERTEEHRDLI	KALGLIKDMI	AAVDLKV
Lbc (Mensch) (76-272)	VTQRITKYPV	LFQRILQCTK	DNEVEQEDLA	QSLSLVKDVI	GAVDSKV
Lfc (Maus) (238-431)	VTQRITKYPV	LINRILQNSH	GVEEYQDLA	SALGLVKELL	SNVDQDV

D

PH-Domäne

p114 (Mensch) (336-439)	QRQLHLEGML	CWKTTSGRILK	DILAILLTDV	LLLLQEKDQK	YVFASVDSKP
p190 (Maus) (1081-1184)	ERALLHDGLV	YWKTATGRFK	DILALLLTDV	LLFLQEKDQK	YIFAASVDQKP
Lbc (Mensch) (309-412)	RKKLVDRGVS	FLKNAAGRLK	EVQAVLLTDI	LVFLQEKDQK	YIFASLDQKF
Lfc (Maus) (471-571)	RRKLIHEGCL	LMKTATGRFK	DVILLLLMTDV	LVFLQEKDQK	YIFTSLD-KP
p114 (Mensch) (336-439)	PVISLQKLIV	REVANEEKAM	FLISASLQGP	EMYEIYTSSK	EDRNAWMAHI
p190 (Maus) (1081-1184)	SVISLQKLIA	REVANEERGMI	FLISASSAGP	EMYEIHTNSK	EERNNWMRI
Lbc (Mensch) (309-412)	TVISLKKLIV	REVAHEEKGL	FLISMGMTDP	EMVEVHASSK	EERNSWIQII
Lfc (Maus) (471-571)	SVVSLQNLIV	RDIANQAKGM	FLISSG--PP	EMYEVHAASR	DDRTTWIRVI
p114 (Mensch) (336-439)	QRAV				
p190 (Maus) (1081-1184)	QQAV				
Lbc (Mensch) (309-412)	QDTI				
Lfc (Maus) (471-571)	QQSV				

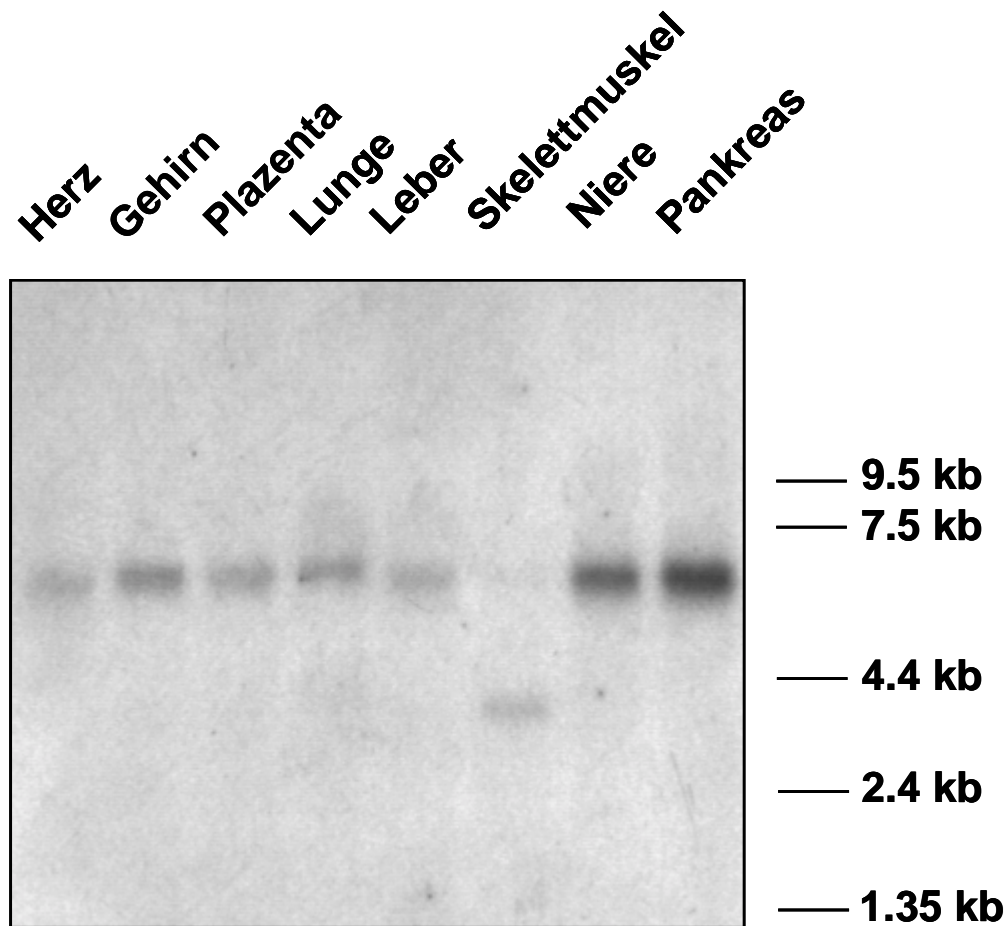


Abbildung 3: Expression von p114-Rho-GEF. Ein Northern Blot, der in jeder Spur ca. 2 µg poly(A)⁺ RNA des angegebenen humanen Gewebes enthielt, wurde mit einer [α -³²P]-dCTP-markierten cDNA-Probe einer Teilsequenz von p114-Rho-GEF (Nukleotid 36-447) hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm.

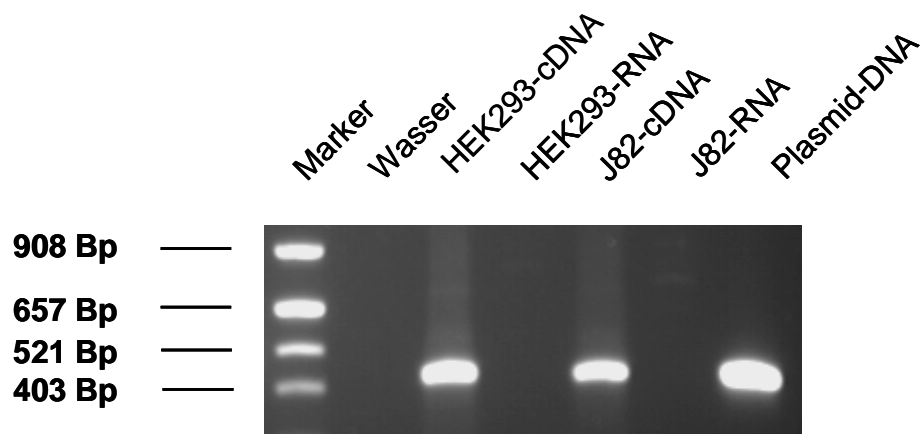


Abbildung 4: Untersuchung der Expression von p114-Rho-GEF in HEK293- und J82-Zellen mittels reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion. Nach Synthese von Erststrang-cDNA aus gesamtzellulärer RNA von HEK293- und J82-Zellen wurden Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung von für die Sequenz von p114-Rho-GEF spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Als Matrize wurden entweder cDNA und nicht revers transkribierte RNA des jeweiligen Zelltyps oder für p114-Rho-GEF kodierende Plasmid-DNA als Positiv-Kontrolle verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel.

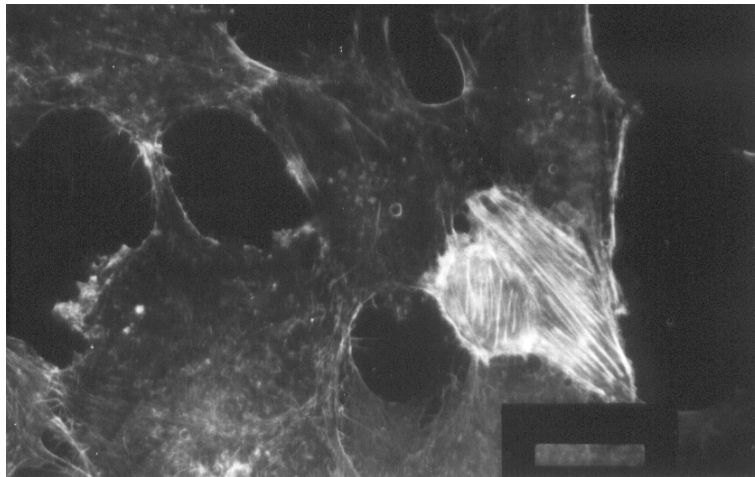
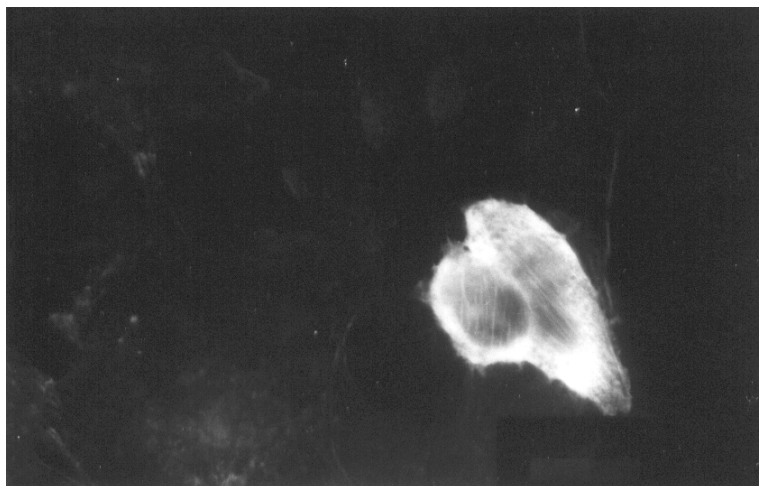
TRITC-Phalloidin-Färbung**Anti-c-Myc-Antikörper-
Darstellung**

Abbildung 5: Ausbildung von Aktin-Streßfasern durch Überexpression von p114-Rho-GEF in J82-Zellen. Nach transients Transfektion von J82-Zellen mit p114-Rho-GEF (10 µg / 5 ml in einem Culture Slide) wurde das Aktin-Cytoskelett mit TRITC-Phalloidin angefärbt (oberes Bild), wobei die in transfizierten Zellen exprimierten c-Myc-Epitop-markierten Proteine von p114-Rho-GEF unter Verwendung eines Anti-c-Myc-Antikörpers mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurden (unteres Bild). Das gezeigte Ergebnis, d.h. das Aktin-Cytoskelett der dargestellten Zelle, ist charakteristisch für das gesamte Experiment und wurden in mehreren gleichen Versuchen bestätigt.

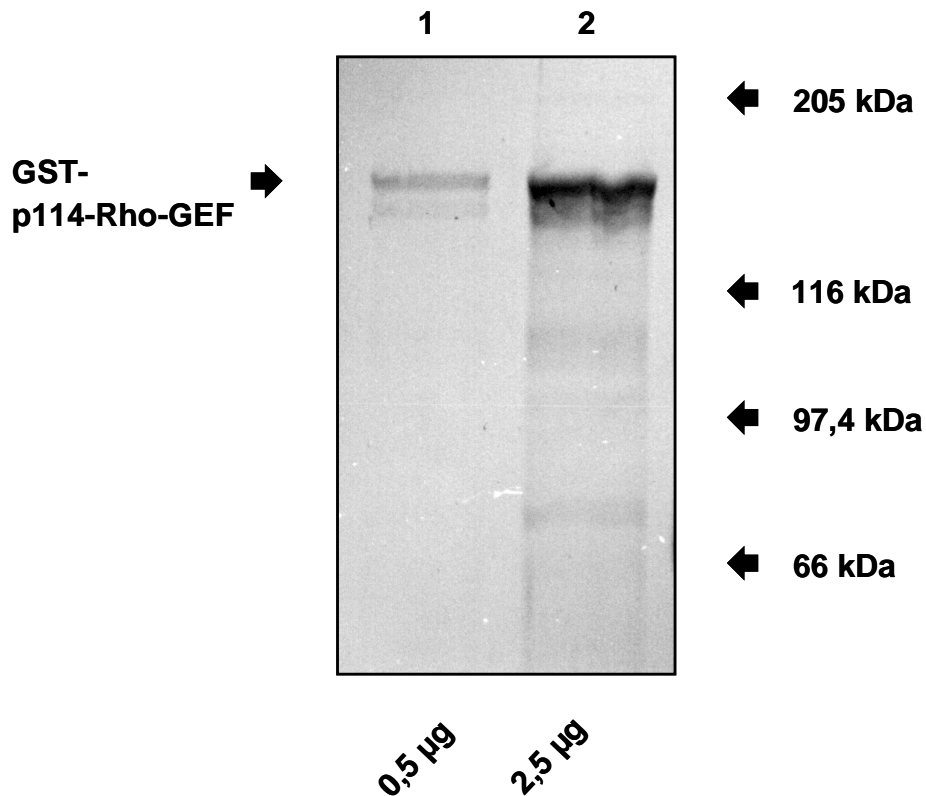


Abbildung 6: Expression von p114-Rho-GEF mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in und Aufreinigung des Proteins aus Sf9-Insektenzellen. Mit GST fusioniertes p114-Rho-GEF wurde mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in Sf9-Insektenzellen exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Das Protein wurde auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches im Anschluß an die Elektrophorese mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Angegeben sind jeweils die aufgetragenen Proteinmengen sowie die Größen des Proteinstandards.

Abbildung 7: Charakterisierung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von p114-Rho-GEF gegenüber Rho-GTPasen. **A:** p114-Rho-GEF stimuliert die GDP-Dissoziation von RhoA. Hierzu wurden rekombinantes RhoA, Rac1 und Cdc42 (je 0,6 μM) mit [^3H]GDP beladen und mit 0,3 μM rekombinantem GST-p114-Rho-GEF in GTP-haltigem Puffer für 40 min bei RT inkubiert. Die Menge an Protein-gebundenem [^3H]GDP wurde nach Filtration über eine Nitrocellulosemembran durch Szintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der noch an den Rho-GTPasen gebundenen Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle, d.h. zur [^3H]GDP-Bindung in Abwesenheit von p114-Rho-GEF. **B:** Konzentrations-Wirkungskurve von gereinigtem rekombinantem GST-p114-Rho-GEF auf die Freisetzung von [^3H]GDP aus GST-RhoA (0.6 μM) nach einer Inkubationszeit von 40 min. Die Aktivität ergibt sich auch hier aus dem prozentualen Anteil der noch an RhoA gebundenen Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit von p114-Rho-GEF. Die gezeigten Daten in Abbildung A und B sind Mittelwerte \pm S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

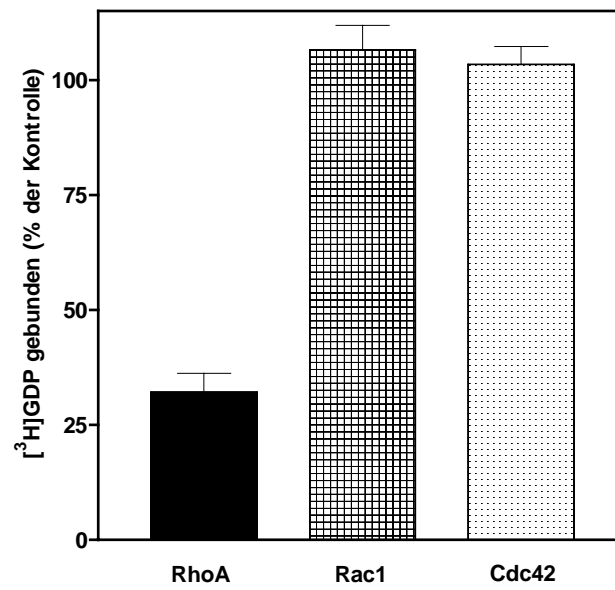
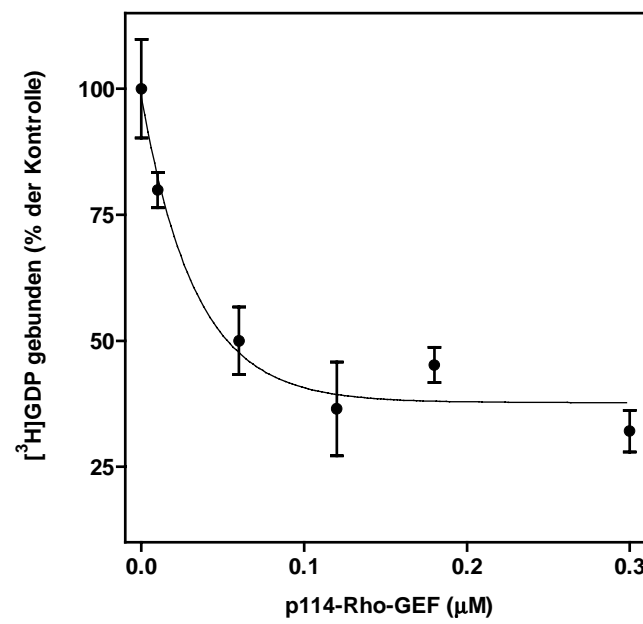
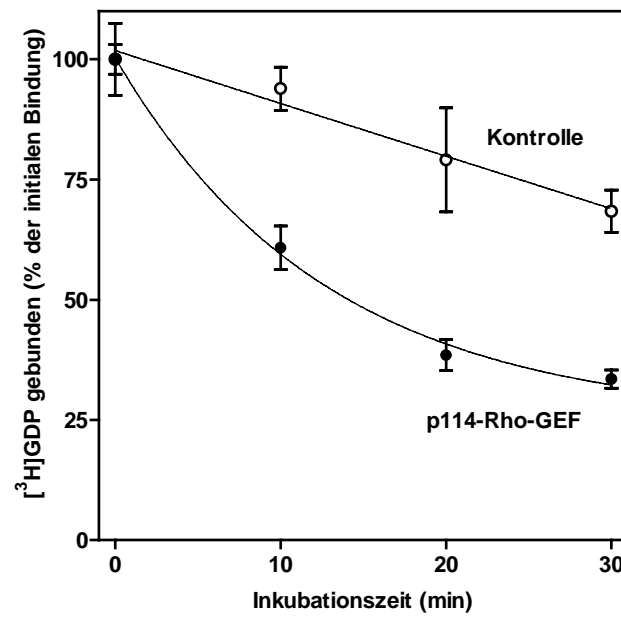
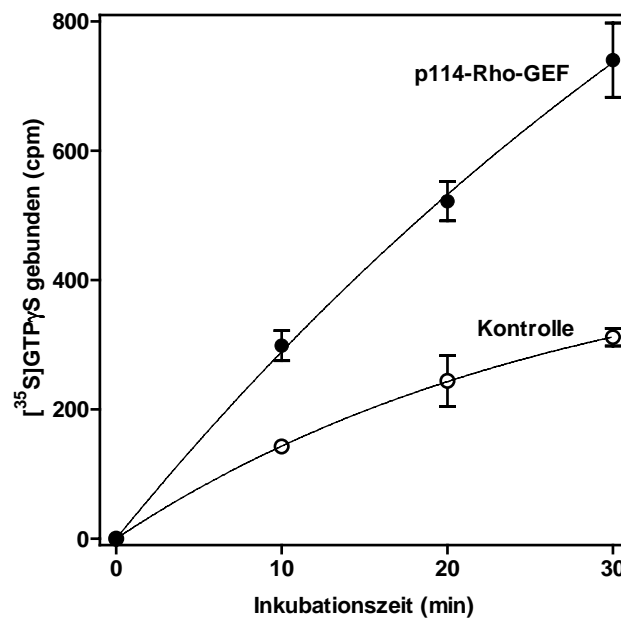
A**B**

Abbildung 8: Zeitverläufe der RhoA-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschaktivität von p114-Rho-GEF. **A:** Zeitverlauf der Dissoziation von [^3H]GDP aus GST-RhoA (0,6 μM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von GST-p114-Rho-GEF (0,45 μM). Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der noch an RhoA gebundenen Radioaktivität nach der entsprechenden Inkubationszeit im Vergleich zur initialen Bindung. **B:** Messung der Bindung von [^{35}S]GTP γ S an GST-RhoA (0,6 μM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von p114-Rho-GEF (0,45 μM). Die gezeigten Daten in Abbildung A und B sind Mittelwerte \pm S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

A**B**

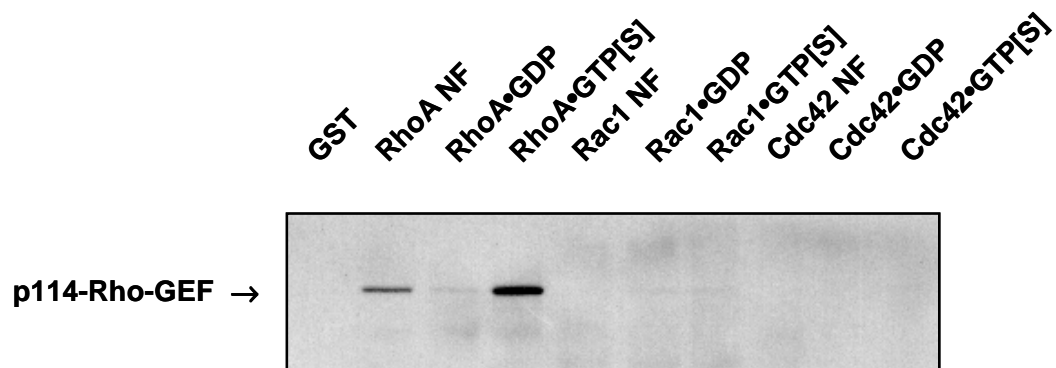


Abbildung 9: Interaktion von p114-Rho-GEF mit Rho-GTPasen. Die Untersuchung der Interaktion der rekombinanten Proteine von GST, GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42 mit c-Myc fusioniertem und in HEK293-Zellen exprimiertem p114-Rho-GEF wurde wie unter "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt. Die Rho-GTPasen waren hierbei wie angegeben entweder im Nukleotid-freien (NF), GDP-gebundenen oder GTP γ S-gebundenen Zustand. Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde gebundenes p114-Rho-GEF mit Hilfe eines Maus-Anti-c-Myc-Antikörpers detektiert.

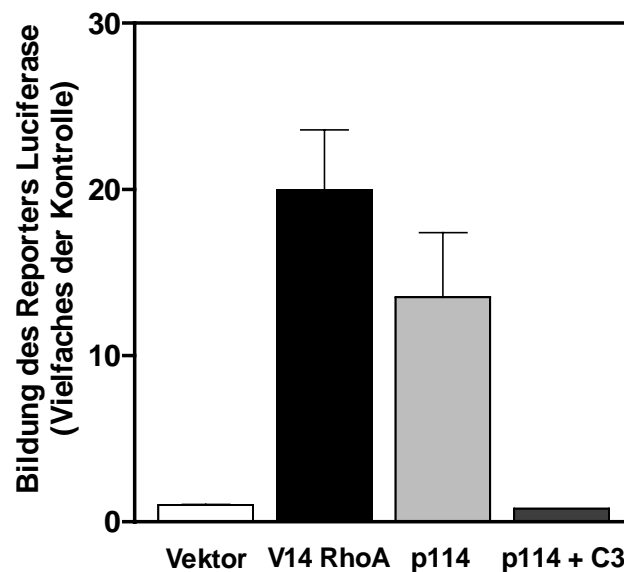


Abbildung 10: Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch p114-Rho-GEF. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression der klassischen Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 1 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase der Gattung *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von konstitutiv aktivem RhoA (V14 RhoA, 1 µg/Brunnen), p114-Rho-GEF (p114, 1 µg/Brunnen) oder p114-Rho-GEF (1 µg/Brunnen) zusammen mit C3-Transferase aus *Cl. botulinum* (0,2 µg/Brunnen) (p114 + C3) kotransfiziert. Die Aktivität der vom Reporterplasmid pSRE.L gebildeten Luciferase des Leuchtkäfers wurde auf die Aktivität der vom Kontroll-Reporters pRL-TK gebildeten Luciferase der Gattung *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

Abbildung 11: Potenzierung der durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimulierten SRF-vermittelten Gentranskription durch p114-Rho-GEF. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression der klassischen Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 1 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase der Gattung *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen) in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von p114-Rho-GEF (0,03 µg/Brunnen) kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit von 10 µM LPA (HEK293-Zellen mit M₂ mAChR) (**A**) oder 1 mM Carbachol (HEK293-Zellen mit M₃ mAChR) (**B**) kultiviert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung von Luciferase aus der Gattung *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten, unstimulierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

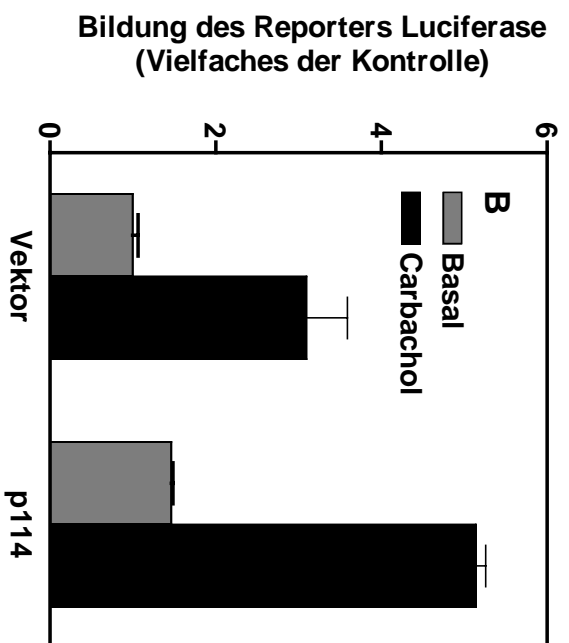
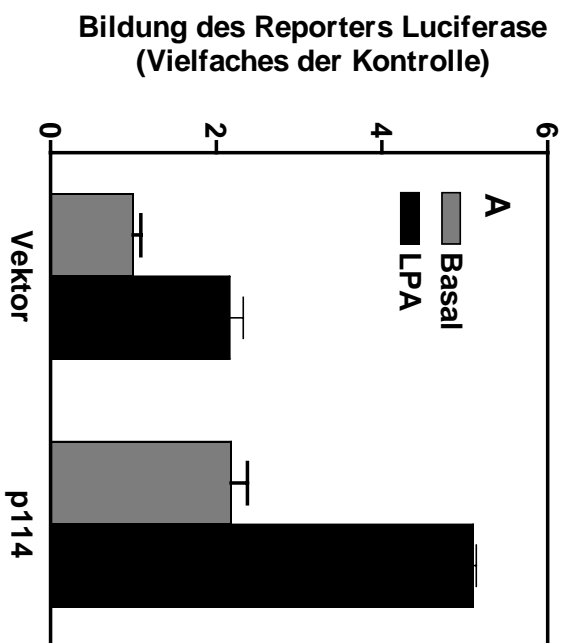
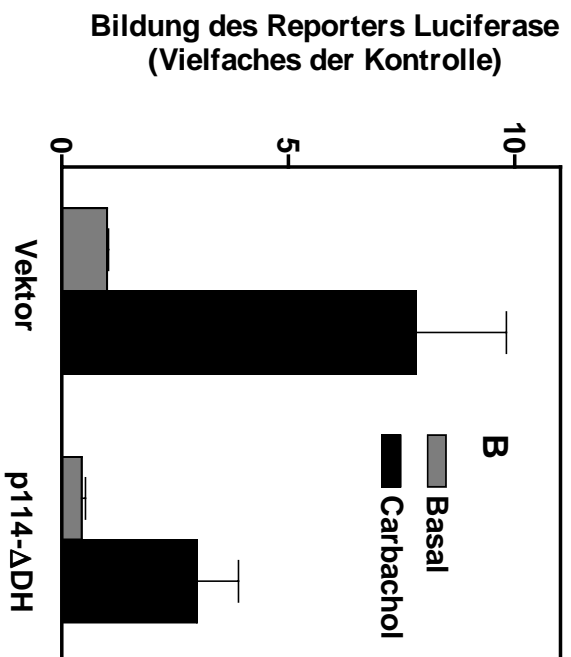
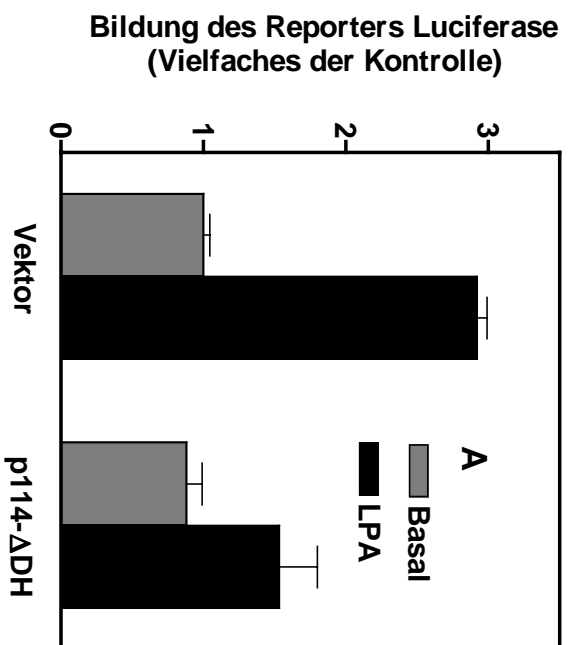


Abbildung 12: Hemmung der durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimulierten SRF-vermittelten Gentranskription durch p114-ΔDH. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen) in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von p114-ΔDH (1 µg/Brunnen) kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit von 10 µM LPA (HEK293-Zellen mit M₂ mAChR) (**A**) oder 1 mM Carbachol (HEK293-Zellen mit M₃ mAChR) (**B**) kultiviert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung von Luciferase aus der Gattung *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten, unstimulierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.



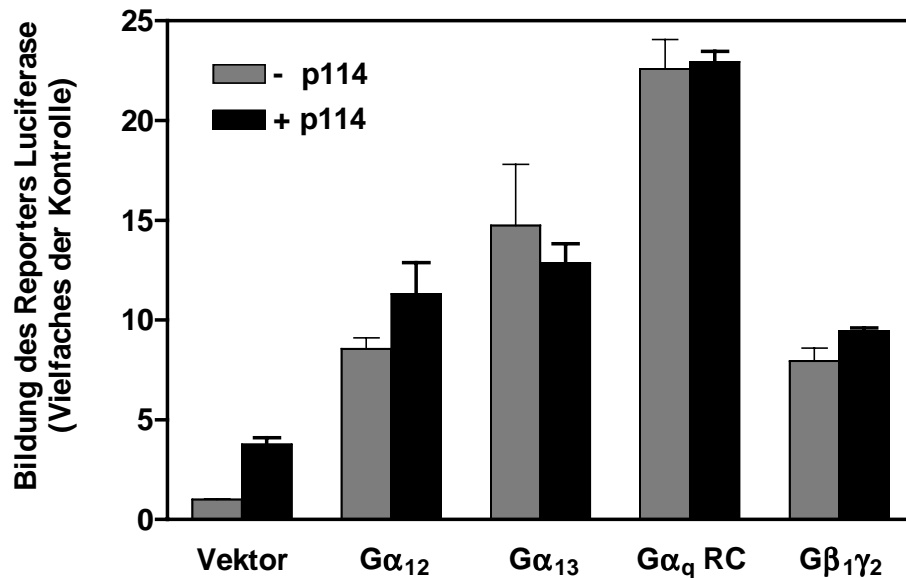


Abbildung 13: Einfluß von p114-Rho-GEF auf die Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch verschiedene Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von p114-Rho-GEF (p114, 0,05 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Gα₁₂, Gα₁₃, konstitutiv aktivem Gα_q (Gα_q RC) oder Gβ₁ zusammen mit Gγ₂ (Gα's: 0,05 µg/Brunnen, Gβ₁/Gγ₂: je 0,5 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung von Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

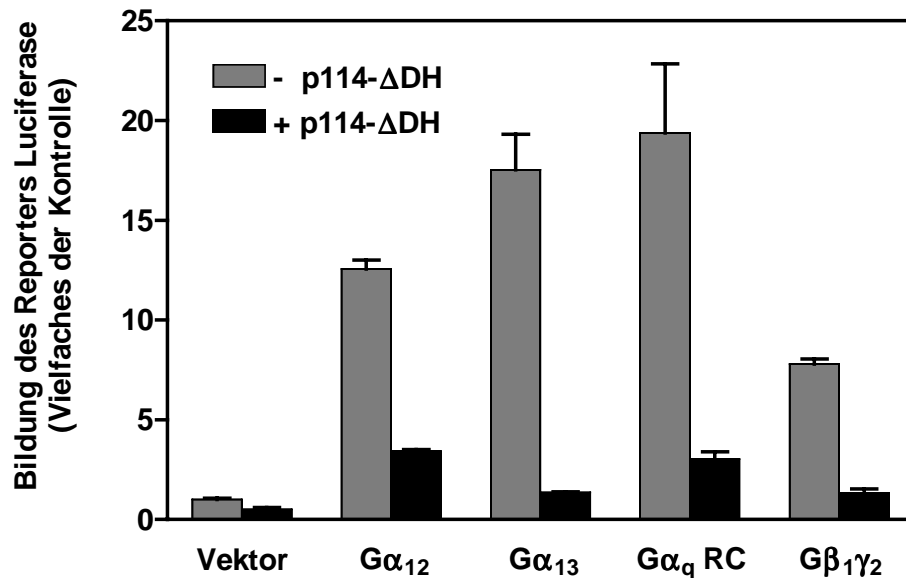


Abbildung 14: Einfluß von p114-ΔDH auf die Stimulation der Gentranskription durch verschiedene Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase des Leuchtkäfers, 1 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von p114-ΔDH (1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Gα₁₂, Gα₁₃, konstitutiv aktivem Gα_q (Gα_q RC) oder Gβ₁ zusammen mit Gγ₂ (Gα's: 0,05 µg/Brunnen, Gβ₁/Gγ₂: je 0,5 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung von Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

3.2 Klonierung und Charakterisierung eines bislang unbekannten Proteins mit Homologien zu den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho-GTPasen

Ausgehend von einem "Expressed sequence tag" (EST), welches wir aufgrund seiner Homologie zu bekannten Rho-GEFs in der DNA-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) fanden, wollten wir ein bislang unbekanntes humanes GEF klonieren und charakterisieren. Die Sequenz dieses EST mit einer Länge von 404 bp wies mit 55 % die größte Homologie zu der DH-Domäne von Ost auf, einem aus der Ratte isolierten Rho-GEF (Horii *et al.*, 1994). Nach reverser Transkription von Gesamt-RNA aus HEK293-Zellen erhielten wir durch PCR-Amplifikation mit Oligonukleotiden, die wir nach der Sequenz des EST ausgewählt hatten, ein erstes Produkt, dessen Sequenzierung die Nukleotidabfolge des EST bestätigte. Um eine Verlängerung der Sequenz des EST zu finden, wurde daraufhin eine humane fetale Gehirn-cDNA-Bibliothek im Bakteriophagen Lambda mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, die durch PCR-Amplifikation der bekannten EST-Sequenz unter Verwendung von [α - 32 P]-dCTP und der für die Sequenz spezifischen Oligonukleotide erhalten wurde. Der berechnete Titer der verwendeten Pagen-Bibliothek betrug 3×10^7 Phagen pro μ l Bibliothek. Um bei der gegebenen genetischen Komplexität der humanen cDNA-Bibliothek eine ausreichende Menge an Phagen bei der Suche einzusetzen, mit der Hoffnung, auch bei einem seltenen Transkript dieses bei einmaligem Durchsuchen in der Bibliothek zu finden, haben wir 1 Mio. Phagen eingesetzt, deren Plaques-Dichte zuvor auf Bakterien-Agarplatten optimiert wurde. Nach zweimaliger Hybridisierung und anschließender Autoradiographie der Filterabzüge konnten wir vier positive Phagen detektieren, von denen Teile ihrer cDNA-Sequenz komplementär zur radioaktiven Sonde waren. Die entsprechenden rekombinanten Phagen wurden aus den Agarplatten isoliert, die Lambda-Phagen-DNA wurde aus kleinen Lysaten aufgereinigt und die cDNA-Inserts mit dem Restriktionsenzym *SalI* aus den Phagen-Armen herausgeschnitten. Nach Subklonieren der so erhaltenen cDNA-Fragmente in den Klonierungsvektor pBluescript SK (+/-) (Fa. Stratagene) zeigte die Sequenzierung, daß ein Klon mit einer Länge von 2070 bp die EST-Sequenz enthielt und einen offenen Leserahmen aufwies. Am 3'-Ende schien die Sequenz aufgrund eines im Leseraster vorhandenen Stop-Codons und eines sich

anschließenden 3'-nichttranslatierten Bereiches, welcher in einem poly(A)-Schwanz endet, vollständig zu sein. Da die bisher erhaltene Sequenz am 5'-Ende weder ein im Leserahmen liegendes Stop-Codon noch ein Start-Codon für Methionin und eine Kozak-Sequenz besaß und somit möglicherweise noch unvollständig war, führten wir weitere Polymerase-Kettenreaktionen mit der humanen fetalen Gehirn-cDNA-Bibliothek durch unter Verwendung von zu dem bekannten 5'-Ende der cDNA und zu den Lambda-Armen komplementären Oligonukleotiden. Nach Subklonierung der so erhaltenen PCR-Produkte mit einer Länge von ca. 200 bp in den Klonierungsvektor pGEM-T (Fa. Promega) und anschließender Sequenzierung ergab sich, daß die Sequenzen der erhaltenen Klone überlappten und die insgesamt isolierte cDNA nun insgesamt 2124 bp umfaßte. Die Untersuchung der Sequenz auf offene Leserahmen ergab nun einen potentiell kodierenden Bereich beginnend mit einem für Methionin kodierenden Triplett ATG von Nukleotid 13 bis 1752 mit einem im Leseraster liegenden Stop-Codon am 5'-Ende, womit diese cDNA nun vollständig zu sein schien. Daraus leitete sich ein Protein von 580 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 63,8 kDa ab (GenBank® accession number AX002220) (Abb. 15A).

Eine Untersuchung der Sequenz auf Homologien zu anderen Proteinen ergab, daß das Protein die für Rho-GEFs typische DH-Domäne zwischen den Aminosäuren 162 und 337 sowie eine PH-Domäne zwischen den Aminosäuren 361 und 466 aufweist. Die größte Homologie innerhalb der DH-Domäne zeigte die abgeleitete Sequenz mit 88 % zu dem C-terminalen Tandem aus DH- und PH-Domäne des bekannten Rho-GEFs Trio (Trio GEF-D2). Dieses besitzt neben diesem für den Guaninnukleotid-Austausch an Rho verantwortlichen Tandem, noch ein weiteres solches N-terminales Tandem aus DH- und PH-Domäne mit Rac-spezifischer GEF-Aktivität (Trio GEF-D1) sowie eine Protein-Serin-/Threonin-Kinase-Domäne, also insgesamt drei Strukturmodule, woraus sich seine Namensgebung ergibt (Debant *et al.*, 1996). Da das aus der neuen cDNA abgeleitete Protein nur ein Tandem aus DH- und PH-Domäne und sonst keine weiteren auffälligen Strukturmerkmale besitzt, haben wir es daher in Anlehnung "Mono" genannt. Auch zu den Austauschfaktoren Dbl und Ost weist Mono mit 64 % bzw. 63 % große Homologien in der DH-Domäne auf (Abb. 15C). Der Sequenzvergleich der PH-Domäne von Mono mit den entsprechenden Domänen der bekannten Rho-GEFs ergab ebenfalls mit 71 % die größte Homologie zu Trio GEF-D2 sowie weitere Homologien zu den Rho-GEFs Dbl, Lsc, Lbc, Lfc und zu dem für diese Domäne

namensgebenden Strukturmotiv in Pleckstrin.

Zur funktionellen Untersuchung von Mono haben wir neben dem Protein ganzer Länge, Mono-FL, weitere cDNA-Fragmente für verkürzte oder deletierte Varianten des Proteins in den Vektor pCMV-Tag3 (Fa. Stratagene) zur Expression in eukaryonten Zellen kloniert, um die exprimierten Proteine über das N-terminal fusionierte c-Myc-Epitop nachweisen zu können. Dabei wurde zur Charakterisierung eine N-terminal verkürzte Variante des Proteins, Mono-DH/PH, sowie zwei Konstrukte, die entweder den N-Terminus einschließlich der DH-Domäne oder den C-Terminus mit der PH-Domäne enthielten, Mono-DH bzw. Mono-PH, und desweiteren eine Deletionsmutante von Mono, der ein kleines Sequenzstück innerhalb der DH-Domäne fehlt, Mono- Δ DH, verwendet (Abb. 15A). Die transiente Transfektion dieser Konstrukte in HEK293- oder J82-Zellen sollte auch hier die Möglichkeit geben, rasch und direkt die Aktivität und Spezifität von Mono in den verschiedenen Experimenten untersuchen zu können.

Für die Klonierung von Mono-FL wurde nun zunächst das 5'-Ende der abgeleiteten Sequenz (bp 4-317) durch eine RT-PCR aus HEK293-Zellen mit zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, wobei das erste, 5'-gelegene Oligonukleotid so ausgewählt wurde, daß es eine vor dem Start-Codon gelegene Kozak-Sequenz und *EcoRI*-Schnittstelle besaß, und das zweite 3'-gelegene Oligonukleotid eine *NdeI*-Schnittstelle aufwies, die die weiteren Klonierungen ermöglichen sollte. Um mögliche, durch die verwendete DNA-Polymerase eingebaute Fehler in der Sequenz auszuschließen, wurde das generierte PCR-Fragment anschließend vollständig sequenziert. Das 3'-Ende der cDNA (bp 317-2124) wurde durch Schneiden des aus der Lambda-Phagen-cDNA-Bibliothek isolierten und in pBlueskript subklonierten cDNA-Fragments mit *NdeI* und *SalI* (Restriktionsenzymchnittstelle in der „Multiple cloning site“) erhalten. Anschließend wurden die beiden Fragmente in den mit *EcoRI* und *SalI* linearisierten Vektor pCMV-Tag3B kloniert, um das exprimierte c-Myc-Fusionsprotein anschließend mit einem Anti-c-Myc-Antikörper nachweisen zu können.

Für die Klonierung des Konstrukts Mono-DH/PH wurde das entsprechende Fragment mit *Eam1104I* (Schnittstelle mit Klenow-DNA-Polymerase I aufgefüllt) und *SalI* (bp 423-2124) aus der cDNA von Mono-FL ausgeschnitten und in den mit *EcoRV* und *SalI* linearisierten Vektor pCMV-Tag3A ligiert. Bei der Klonierung von Mono-DH wurde der mit *EcoRI* und *EcoRV* linearisierte Vektor pCMV-Tag3B verwendet. Als Insert diente das mit

EcoRI und *Bsh1236I* ausgeschnittene Mono-cDNA-Fragment (bp 4-1150). Die Klonierung von Mono-PH erfolgte so, daß die entsprechende Sequenz als *PagI* (Schnittstelle mit Klenow-DNA-Polymerase I aufgefüllt)/*SalI*-Fragment (bp 896-2124) in den mit *EcoRV* und *SalI* geschnittenen Vektor pCMV-Tag3A ligiert wurden. Das letzte Konstrukt, die Deletionsmutante Mono- Δ DH, wurde durch Ausschneiden des vorderen Teils mit *EcoRI* und *PvuII* (bp 4-841) und des hinteren Teils mit *PvuII* und *SalI* (bp 907-2124) aus der cDNA von Mono-FL und anschließende Klonierung dieser beiden Fragmente in den mit *EcoRI* und *SalI* linearisierten Vektor pCMV-Tag3B erhalten. Im Westernblot ließen sich, wie hier beispielhaft für alle Experimente gezeigt, die exprimierten Proteine im Lysat der transfizierten Zellen mit Hilfe eines gegen das fusionierte c-Myc-Epitop gerichteten Anti-c-Myc-Antikörpers eindeutig nachweisen. Die Größen der detektierten Proteine waren dabei in guter Übereinstimmung mit den zuvor berechneten molekularen Massen (Abb. 15B).

Die Untersuchung der Expression von Mono in verschiedenen humanen Geweben mit Hilfe eines Northern Blots führte zur Detektion eines Transkripts von etwa 3,3 kb Länge, welches sehr dominant im Gehirn und mit schwächerer Intensität im Herzen nachgewiesen werden konnte (Abb. 16). Des weiteren konnten wir mittels reverser Transkription und PCR unter Verwendung von für Mono spezifischen Oligonukleotiden erwartungsgemäß (vergleiche Klonierungen oben) ein Transkript in HEK293-Zellen nachweisen, was die endogene Expression von Mono in diesen Zellen bestätigte. Dagegen erhielten wir bei der PCR mit Erststrang-cDNA von J82-Zellen kein Produkt, wobei im gleichen Ansatz das erwartete Produkt in der Positivkontrolle mit für Mono-kodierender Plasmid-DNA nachgewiesen werden konnte, was nahelegt, daß Mono in den von uns verwendeten J82-Zellen endogen nicht exprimiert wird (Abb. 17A und B). Diese Befunde lassen darauf schließen, daß Mono nur sehr eingeschränkt und gewebespezifisch exprimiert wird.

Für die Funktionsanalyse von Mono sollte nun zunächst der durch das aufgereinigte Protein stimulierte Guaninnukleotid-Austausch an Rho-GTPasen *in vitro* untersucht werden. Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine von Mono mit Hilfe des Baculovirus/Sf9-Systems wurde die für Mono-FL kodierende cDNA durch Ligation des durch PCR generierten *EcoRI/NdeI*-Fragments (bp 4-317) und des aus dem Vollängen-Konstrukt in pCMV-Tag3 ausgeschnittenen *NdeI/EcoRV*-Fragments (bp 317-1885) in den mit *EcoRI* und *SmaI* linearisierten Baculovirus-Transfervektor pAcGHIT-A kloniert. Das nach Infektion von

Sf9-Zellen mit den rekombinanten, für Mono-FL kodierenden Baculoviren exprimierte GST-Fusionsprotein wurde mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose-„Beads“ aufgereinigt. Die nachfolgende SDS-PAGE und Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau zeigte eine weitgehend homogene Proteinbande bei einem Molekulargewicht von etwa 94 kDa (entspricht ~ 64 kDa Mono-FL + ~ 30 kDa GST) (Abb. 18).

Zur Messung der Aktivität wurde das aufgereinigte Protein GST-Mono-FL nun mit den rekombinanten Fusionsproteinen GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42, die zuvor mit [3 H]GDP beladen worden waren, in GTP-haltigem Puffer für 40 min inkubiert. Unter dem Einfluß von Mono kam es konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Menge an RhoA-gebundenem [3 H]GDP um bis zu 50 % im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Mono-FL, wobei nur deutlich subäquimolare Mengen von Mono-FL verglichen mit RhoA notwendig waren. Dagegen wurde die an Rac1 oder Cdc42 gebundene Radioaktivität durch die Zugabe von Mono-FL nicht verändert. Diese katalytische Freisetzung von radioaktivem GDP aus RhoA war halbmaximal bei einer Konzentration von $0,06 \mu\text{M}$ Mono-FL, wobei maximale Effekte bei Konzentrationen $\geq 0,2 \mu\text{M}$ beobachtet wurden (Abb. 19). Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Bindung des stabilen GTP-Analogons [35 S]GTP γ S an RhoA zeigten, daß Mono-FL die eigentlich langsame GTP-Bindung deutlich stimulierte (Abb. 20).

Um diese Befunde der Wirkung von Mono auf Rho-GTPasen weiter zu untermauern, wurde nun wiederum die Spezifität der Interaktion von Mono-FL mit den drei Rho-Proteinen und die Abhängigkeit dieser Interaktion vom gebundenen Nukleotid *in vitro* untersucht. Wir transfizierten dazu HEK293-Zellen mit der für das N-terminal verkürzte c-Myc-Fusionskonstrukt Mono-DH/PH kodierenden cDNA. Das Lysat wurde anschließend mit den Glutathion-Sepharose-„Beads“ von GST-RhoA, -Rac1 und -Cdc42 inkubiert. Wie Abb. 21A zeigt, konnten wir eine Bindung von Mono nur an RhoA beobachten, und zwar in allen drei untersuchten Zuständen, wobei die stärkste Interaktion mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA erfolgte. Mono-DH/PH band dagegen weder an GST noch an GST-Rac1 oder GST-Cdc42, in keinem der drei Nukleotid-gebundenen Zustände. Gleiche Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der Interaktion des Proteins ganzer Länge, Mono-FL, mit den Rho-GTPasen erhalten (Daten nicht gezeigt). In gleicher Weise haben wir dann noch die Bindung der Deletionsmutante Mono- Δ DH gegenüber RhoA, Rac1 und Cdc42 untersucht. Diese Variante des Proteins sollte katalytisch inaktiv sein und die GTPase RhoA nicht mehr binden

können. Tatsächlich konnte eine Interaktion dieser Mutante mit keiner der Rho-GTPasen beobachtet werden (Abb. 21B). Daher scheint Mono nicht nur ein Rho(A)-spezifisches GEF zu sein, sondern auch selektiv nur an Rho(A) und nicht an Rac1 oder Cdc42 zu binden. Die Variante Mono- Δ DH war dagegen nicht mehr in der Lage, an Rho(A) zu binden.

Im folgenden sollte die Aktivität von Mono in intakten Zellen weiter charakterisiert werden. Die Expression von Mono-FL zeigte einen deutlichen Effekt auf die Organisation des Aktin-Cytoskeletts von J82-Zellen. In den transfizierten Zellen, die wir aufgrund der Expression des mit Mono-FL fusionierten c-Myc-Epitops durch Anfärbung mit einem Anti-c-Myc-Antikörper und einem sekundären FITC-markierten Antikörper fluoreszenzmikroskopisch identifizieren konnten, kam es zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern, eine RhoA-regulierte zelluläre Antwort, die in den nicht transfizierten Zellen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 22). Somit scheint Mono auch *in vivo* in der Lage zu sein, RhoA zu aktivieren.

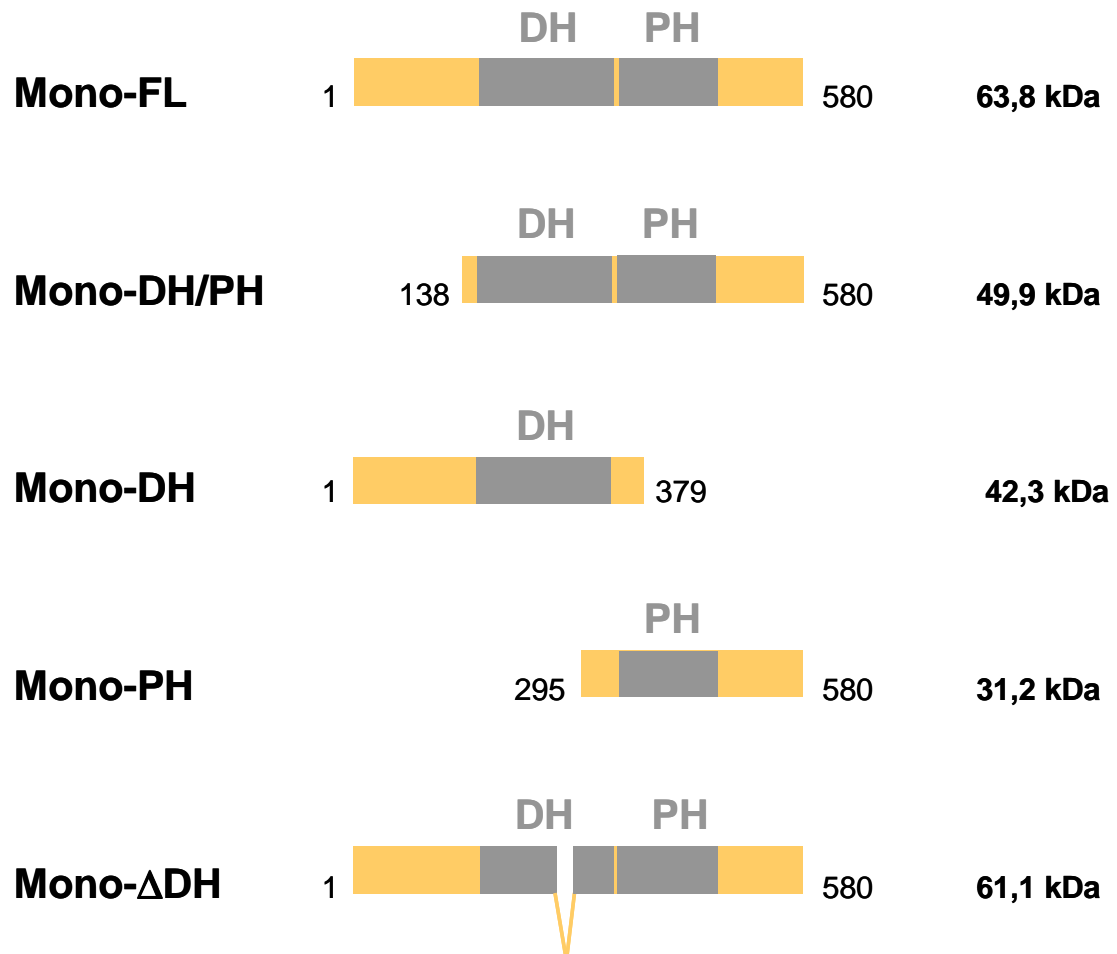
Schließlich wurde zur quantitativen Erfassung der potentiellen Aktivierung von Rho-GTPasen durch Mono in intakten Zellen die Stimulation der über den „Serum response factor“ vermittelten Gentranskription bestimmt. Wurden HEK293-Zellen mit einer ausreichend hohen Menge an Plasmid-DNA für Mono-FL transfiziert, so wurde die Bildung des Reporters Luciferase deutlich stimuliert. Da dieser Effekt durch die Koexpression von C3-Transferase komplett unterdrückt werden konnte und durch die dominant negativen Mutanten von Rac1 und Cdc42 nicht beeinflußt wurde, konnten wir nochmals belegen, daß Mono ein spezifisch auf Rho wirkender Austauschfaktor ist. (Abb. 23). Des weiteren wurde nun die Beteiligung von Mono an der Aktivierung von Rho durch den G-protein gekoppelten LPA-Rezeptor untersucht, insbesondere auch im Hinblick auf die hierfür essentiellen Molekülteile von Mono. Wurden HEK293-Zellen mit einer sehr viel geringeren Menge an Plasmid-DNA für Mono-FL transfiziert, die *per se* kaum die Gentranskription stimulierte, so steigerte diese die durch LPA induzierte, 3- bis 4-fache Stimulation der Bildung des Reporters Luciferase deutlich auf das 6- bis 7-fache (Abb. 24A). Die Expression der Deletionsmutante Mono- Δ DH, ohne vollständige DH-Domäne, welche katalytisch inaktiv und sich möglicherweise dominant negativ verhalten sollte, hemmte die durch LPA stimulierte Gentranskription um etwa 50 % (Abb. 24B). Diese beiden Befunde legten also zunächst nahe, daß Mono an der Aktivierung von RhoA durch den LPA-Rezeptor beteiligt ist, zumindest bei der Induktion der

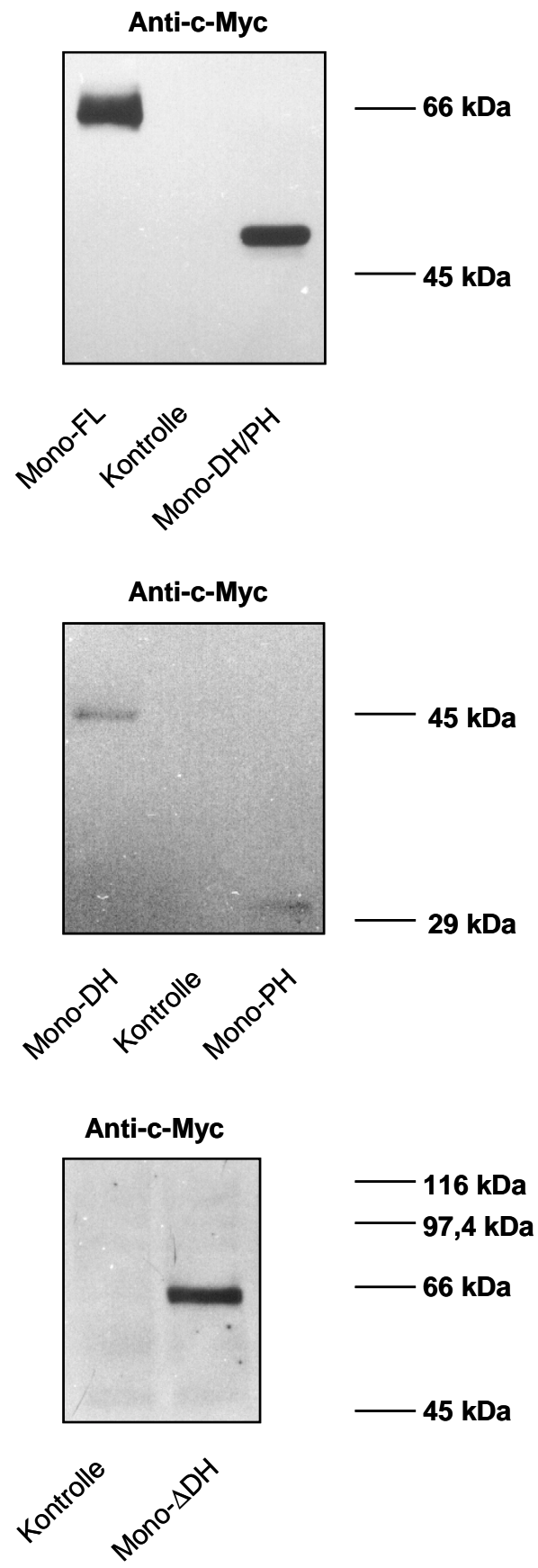
Gentranskription. Da katalytisch inaktives Mono- Δ DH die Gentranskription jedoch nicht vollständig unterdrückte, könnten noch weitere Signalwege vom LPA-Rezeptor zur Aktivierung von RhoA und der Gentranskription existieren. Um die funktionellen Molekülteile und Domänen von Mono bezüglich ihrer Rolle für die Aktivierung der GEF-Aktivität durch den LPA-Rezeptor und die dadurch ausgelösten Signalprozesse weiter zu charakterisieren, exprimierten wir die verkürzten Mutanten Mono-DH und Mono-DH/PH, die entweder nur aus dem N-Terminus einschließlich der DH-Domäne ("Vorne") bzw. nur aus dem C-Terminus mit der DH- und PH-Domäne bestehen ("Hinten"). Während die Expression des hinteren Molekülteils Mono-DH/PH allein keinen Einfluß auf die Stimulation der Gentranskription hatte, wurde die durch LPA induzierte Bildung des Reporters Luciferase signifikant gesteigert, womit sich dieses Konstrukt also ähnlich wie das Protein ganzer Länge verhielt. Das C-terminal verkürzte Konstrukt Mono-DH, zeigte dagegen *per se* eine konstitutive Aktivität und stimulierte die Gentranskription, wobei diese Steigerung zur Stimulation durch LPA additiv war. Somit scheint die Regulation der GEF-Aktivität durch oberhalb gelegene Signalprozesse über den hinteren C-Terminus von Mono vermittelt zu werden, der zudem offenbar die konstitutive Aktivität des Proteins verhindert (Abb. 25).

Um zu untersuchen, welche α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine an der Aktivierung von Mono durch den LPA-Rezeptor beteiligt sind, wurden Mono-FL und die Deletionsmutante Mono- Δ DH zusammen mit $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ sowie konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ RC) exprimiert, die die Bildung des Reporters Luciferase jeweils zwischen 10- und 30-fach stimulierten. Während die Koexpression von Mono-FL keinen Einfluß auf den Effekt von $G\alpha_{12}$ hatte, und den Effekt von $G\alpha_{13}$ nur wenig steigerte, wurde die durch $G\alpha_q$ RC induzierte Gentranskription sehr deutlich gesteigert (Abb. 26A). Dagegen führte die Koexpression von Mono- Δ DH zu einer starken Hemmung der Stimulation der Gentranskription aller drei untersuchten G-Protein- α -Untereinheiten (Abb. 26B). Im folgenden wurde nun untersucht, ob die beiden verkürzten Varianten, Mono-DH und Mono-DH/PH, die Stimulation der Gentranskription durch $G\alpha_q$ RC in ähnlicher Weise wie die Stimulation durch LPA modulierten. Tatsächlich steigerte die Koexpression des C-Terminus von Mono, Mono-DH/PH, massiv die durch $G\alpha_q$ RC induzierte Gentranskription, ohne jedoch selbst *per se* aktiv zu sein, was wiederum die Vorstellung bestätigt, daß dieser Molekülteil für die Aktivierung der GEF-Aktivität durch Rezeptoren und die von ihnen aktivierten G-Proteine

essentiell ist. Der N-Terminus von Mono zeigte dagegen wiederum konstitutive Aktivität, und hemmte sogar eher die Stimulation des Reporters Luciferase durch $G\alpha_q$ RC (Abb. 27). Schließlich konnte gezeigt werden, daß auch das verkürzte Konstrukt Mono-PH, dem der N-Terminus einschließlich der katalytischen DH-Domäne fehlt, ebenso wie die Deletionsmutante Mono- Δ DH, die Stimulation der Gentranskription durch den LPA-Rezeptor (Abb. 28) und die Stimulation durch $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$ RC hemmte (Abb. 29). Bei dem von uns isolierten und klonierten Protein Mono handelt es sich also offenbar um ein für Rho spezifisches GEF, das über den C-Terminus durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden kann und den Effekt von $G\alpha_q$ auf Rho vermittelt.

Abbildung 15: Aufbau des Proteins Mono: Schematische Darstellung der zur Funktionsanalyse exprimierten Proteine und Nachweis im Westernblot; Vergleich der homologen Domänen mit anderen Rho-GEFs der Dbl-Familie. A: Das Protein von Mono besitzt die für alle Rho-GEFs typischen DH- und PH-Domänen. Zur Funktionsanalyse wurden neben dem Protein ganzer Länge (Mono-FL) die Konstrukte Mono-DH/PH, Mono-DH, Mono-PH und Mono- Δ DH (Deletion: AS 278-299) verwendet. Angegeben sind jeweils die erste und letzte Aminosäure sowie das berechnete Molekulargewicht. **B:** Zum Nachweis der Expression von Mono-FL und den verwendeten Konstrukten in transfizierten HEK293-Zellen wurden Lysate dieser Zellen (je 50 μ g Protein) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Hilfe eines Anti-c-Myc-Antikörpers detektiert. **C:** Homologien der DH-Domäne von Mono (AS 162-337) zu den entsprechenden Sequenzen der bekannten Rho-GEFs Trio (C-terminale der beiden DH-Domänen, Δ 2), Dbl und Ost. Identische bzw. homologe Aminosäuren aus einer der funktionell ähnlichen Gruppen [hydrophobe Reste (I, V, L, M), aromatische Reste (F, W, Y), saure Reste (D, E), basische Reste (K, R), ungeladen-polare Reste (N, Q)] sind schwarz unterlegt dargestellt. **D:** Homologien der PH-Domäne von Mono (AS 361-466) zu den entsprechenden Sequenzen der Rho-GEFs Trio (C-terminale der beiden DH-Domänen, Δ 2), Dbl, Lsc, Lbc, Lfc, sowie des Pleckstrin-Proteins. Identische bzw. homologe Aminosäuren sind schwarz unterlegt dargestellt.

A

B

C

DH-Domäne

Mono (Mensch) (162-337)	MYVLSELVET	EKMYVDDLQ	IVEGYMATMA	AQGV---PE	SLRGRDRIVE
TrioD2 (Mensch) (1914-2087)	HYVLQELVET	ERDYVRDLGY	VVEGYMALMK	EDGV---PD	DMKGKDKIVF
Dbl (Mensch) (497-676)	NHVLNELIQT	ERVYVRELYT	VLLGYRAEMD	NPEMFDLMP	LLRNKKDILF
Ost (Ratte) (444-653)	RHVMNELLD	ERAYVEELLC	VLEGYAAEMD	NPLMAHLIST	GLQNKKNILF
Mono (Mensch) (162-337)	GNIQIYEW	RDYFLQELQR	CLKDPDWLAQ	LFIKHERRLH	MYVVYCQNK
TrioD2 (Mensch) (1914-2087)	GNIHQIYDWH	RDFFLGELEK	CLEDPEKLGS	LFVKHERRLH	MYIAYCQNK
Dbl (Mensch) (497-676)	GNMAEIEYFH	NDIFLSSLEN	CAHAPERVGP	CFLERKDDFQ	MYAKYCQNK
Ost (Ratte) (444-653)	GGMETIYHFH	NRIFLRELES	CIDCEPELGR	CFLERMEEFQ	IYEKYCQNK
Mono (Mensch) (162-337)	KSEHVSEFG	DSYFEELRQQ	-LGHRLQLND	LLIKPVQORIM	KYQLLLKDFL
TrioD2 (Mensch) (1914-2087)	KSEHIVSEYI	D-TFFEDLKQ	RLGHRLQLTD	LLIKPVQORIM	KYQLLLKDFL
Dbl (Mensch) (497-676)	RSETIWRKYS	ECAFFQECQR	KLKHLRLDS	YLLKPVQORIT	KYQLLLKELL
Ost (Ratte) (444-653)	RSESLWRQCS	DCPFFQECQK	KLDHKLSDS	YLLKPVQORIT	KYQLLLKEML
Mono (Mensch) (162-337)	KYYNRACMDT	ADLEQAVEVM	CFVPRKRCNDM	M	
TrioD2 (Mensch) (1914-2087)	KYSKKASLDT	SELERAVEVM	CIVPRRCNDM	M	
Dbl (Mensch) (497-676)	KYSKCEGSA	L-LKKALDAM	LDLLKSVNDS	M	
Ost (Ratte) (444-653)	KYSKHCEGAE	D-LQEALSSI	LGILKAVNDS	M	

D

PH-Domäne

Mono (Mensch) (361-466)	FWTEPEACG	LL---SSRGR	--ER--RVFL	FEQIIIFSEA	-LGGGVRGGT
TrioD2 (Mensch) (2111-2202)	FLVTDQDAGL	L-----PRCR	--ER--RIFL	FEQIVIFSEP	-LDKKKGFSM
Dbl (Mensch) (710-809)	AT-----	---KMKDLAR	FKPMQRHFL	YEKAIVFCKR	RVESGEGSDR
Lsc (Maus) (644-760)	-K-KLVHEGP	LTWRVTK-DK	AIEV--HVLL	LDDLELLLQ	QDERLLKSH
Lbc (Mensch) (309-413)	RK-KLVRDGS	VELKNAA-GR	LKEV--QAVL	LIDILVFLQE	KDQKYIFAS-
Lfc (Maus) (471-572)	RR-KLIHEGC	LLMKTAT-GR	FKDV--LILL	MDVLVFLQE	KDQKYIFTS-
Pleckstrin (1-101)	MEPKRIREGY	LVKKGSVFNT	WKPM--WVVL	LEDGIEFYKK	KSDN-----
Mono (Mensch) (361-466)	QPGYV-----	---YKNSIKV	SCLGLEGNLQ	GDPFCRFAITS	RGPEGGI-QR
TrioD2 (Mensch) (2111-2202)	-PGFL-----	---FKNSIKV	SCLCLEENVE	NDPCKFALST	RTGDVV--ET
Dbl (Mensch) (710-809)	YPSYS-----	---FKHCWK	DEVGITEYVK	GDNRKFEIY	GEKE----EV
Lsc (Maus) (644-760)	SRTLTPTPDG	KTMLRPVLR	TSAMTREVAT	DHKAFYVIFT	WDQE---AQI
Lbc (Mensch) (309-413)	---LDQKF--	-----TVISL	KKLIVREVAH	EKGLFLISM	GMTD---PEM
Lfc (Maus) (471-572)	---LD-KP--	-----SVVSL	QNLIVRDIAN	QAKGMFLISS	G--P---PEM
Pleckstrin (1-101)	-----SEPK	MIPLKG----	-STLTSPCQD	FGKRMFVFKI	TTTK---QQD
Mono (Mensch) (361-466)	YVLQAADPAI	SQAWIKHVAQ	ILE		
TrioD2 (Mensch) (2111-2202)	FILHSSSPSV	RQTWIHEINQ	ILE		
Dbl (Mensch) (710-809)	YIVQASNV	KMTWLKEIRN	ILL		
Lsc (Maus) (644-760)	YELVAQTSSE	RKNWCNLITE	TAG		
Lbc (Mensch) (309-413)	VEVHASSKEE	RNSWIQIIQD	TIN		
Lfc (Maus) (471-572)	YEVHAASRDD	RITTWIRVIQ	SVR		
Pleckstrin (1-101)	HFFQAAFLEE	RDWVRDINK	AIK		

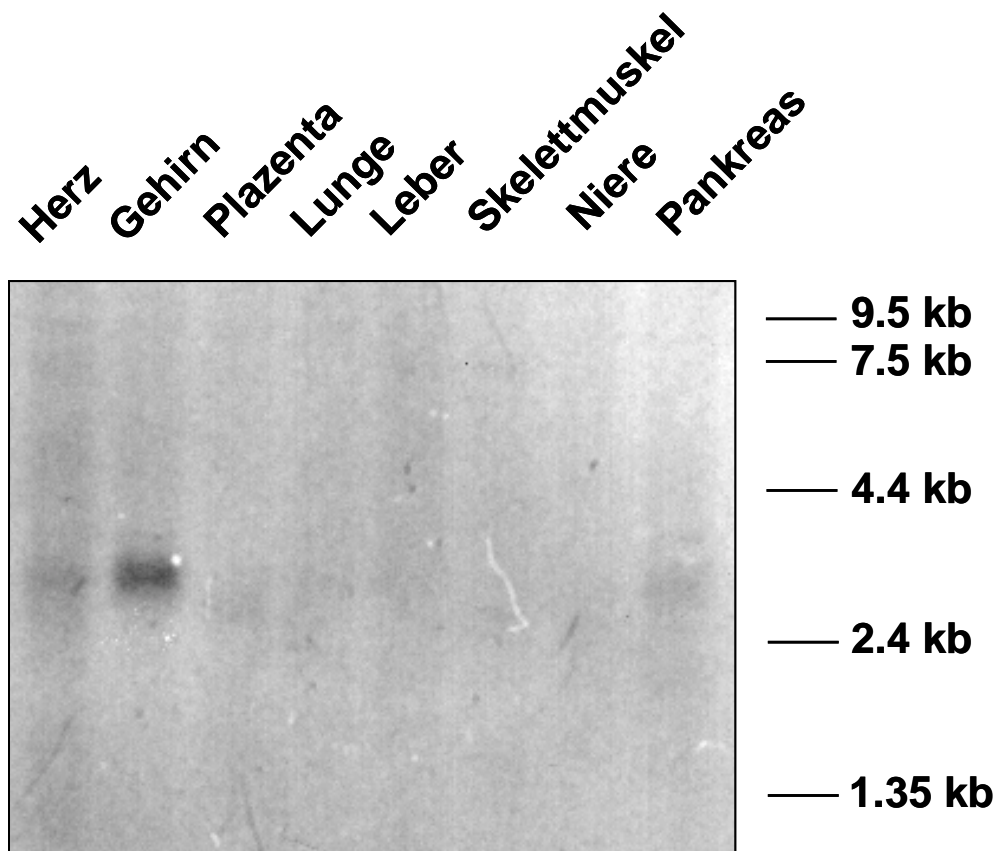
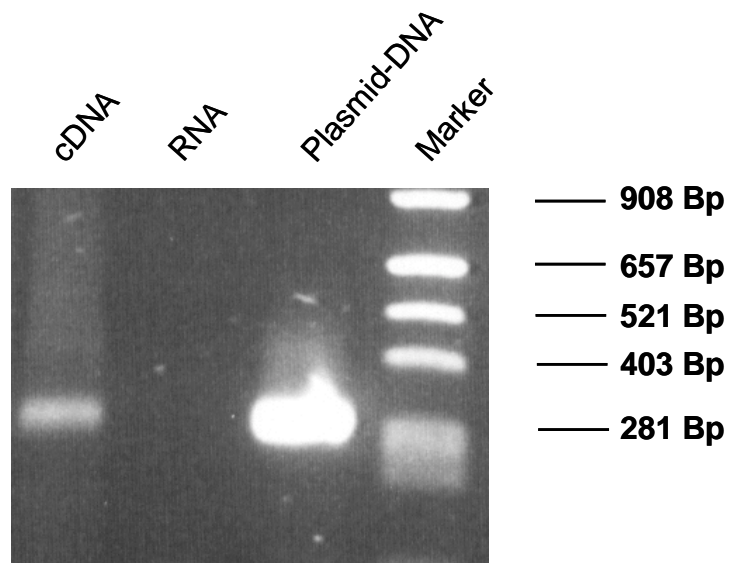
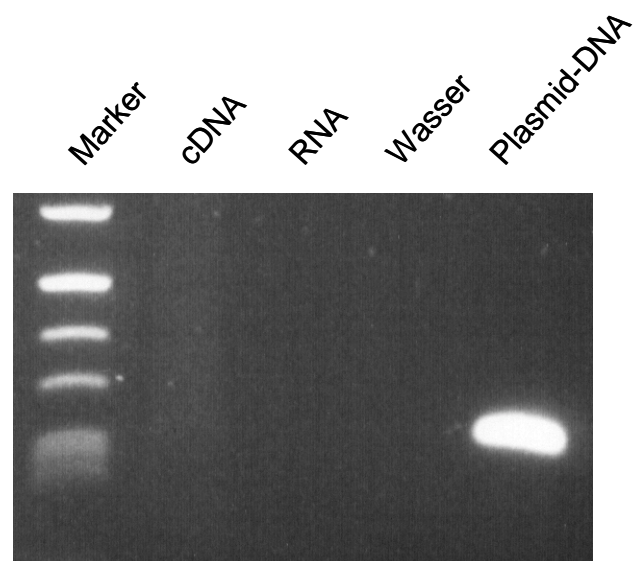


Abbildung 16: Expression von Mono. Zur Hybridisierung eines Northern Blots aus poly(A)⁺ RNA, welche aus den angegebenen humanen Geweben isoliert wurde, wurde eine [α -³²P]-dCTP-markierten cDNA-Probe einer Teilsequenz von Mono (Nukleotid 55-388) verwendet. Dargestellt ist das Autoradiogramm.

Abbildung 17: Untersuchung der Expression von Mono in HEK293- und J82-Zellen mittels reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion. Nach der Synthese von Erststrang-cDNA aus gesamtzellulärer RNA von HEK293- (**A**) und J82-Zellen (**B**) wurden Polymerase-Kettenreaktionen mit für Mono spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Als Matrize wurde entweder cDNA, nicht revers transkribierte RNA des jeweiligen Zelltyps oder für Mono kodierende Plasmid-DNA als Positiv-Kontrolle verwendet. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel.

A**HEK293-Zellen****B****J82-Zellen**

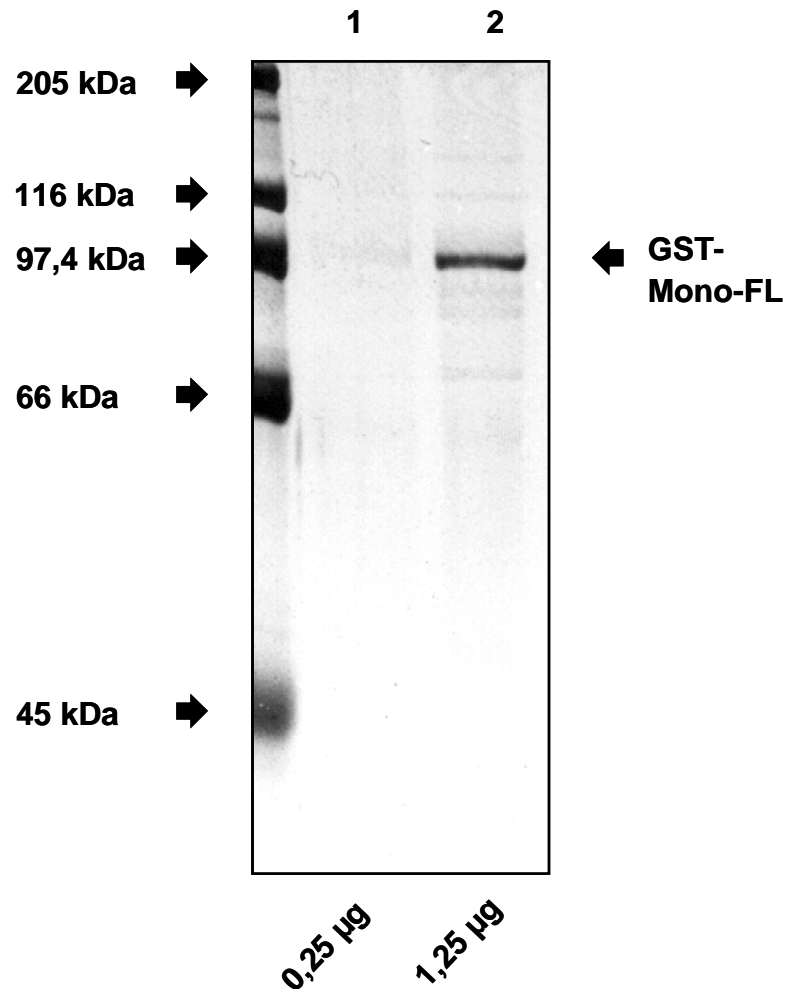


Abbildung 18: Expression von Mono-FL mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in und Aufreinigung des Proteins aus Sf9-Insektenzellen. Das mit GST fusionierte Protein ganzer Länge Mono-FL wurde mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in Sf9-Insektenzellen exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Das Protein wurde auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches im Anschluß an die Elektrophorese mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Angegeben sind jeweils die aufgetragenen Proteinmengen sowie die Größen des Proteinstandards.

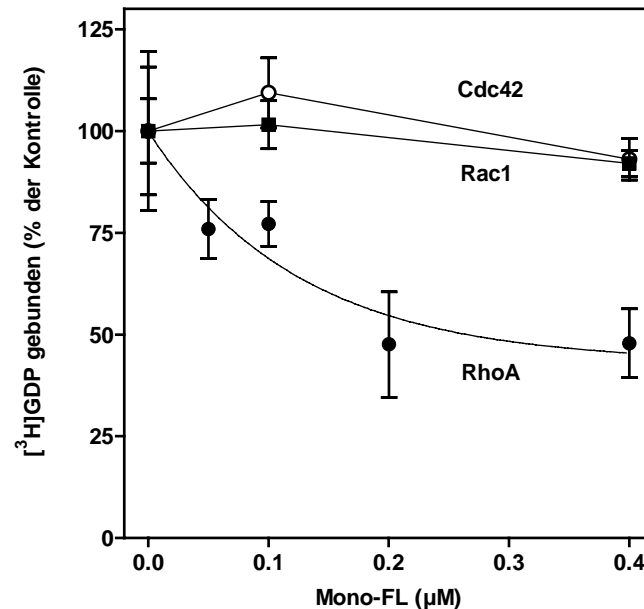


Abbildung 19: RhoA-spezifische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Mono. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von gereinigtem rekombinantem GST-Mono-FL auf die Freisetzung von $[^3\text{H}]\text{GDP}$ aus GST-RhoA, Rac1 und Cdc42 (jeweils 0,6 µM) nach einer Inkubationszeit von 40 min bei RT. Die Menge an Protein-gebundenem $[^3\text{H}]\text{GDP}$ wurde nach Filtration über eine Nitrocellulosemembran durch Szintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der noch an den Rho-GTPasen gebundenen Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit von Mono-FL. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

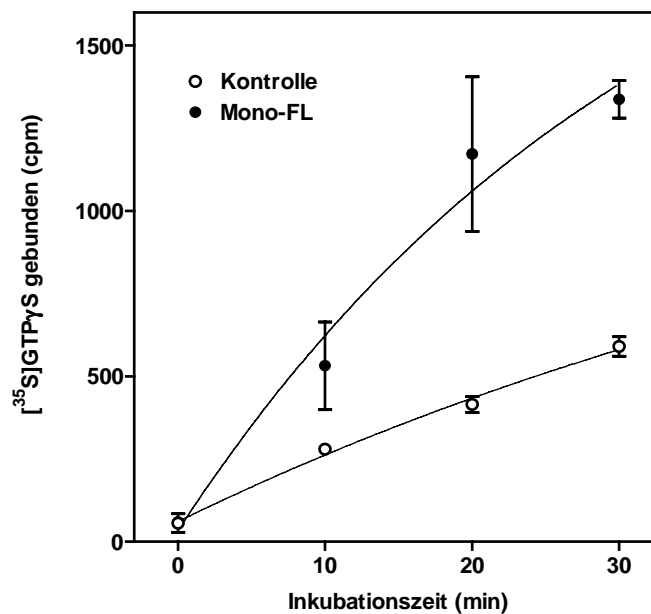


Abbildung 20: Zeitverlauf der Bindung von [³⁵S]GTPγS an RhoA unter dem Einfluß von Mono-FL. Gemessen wurde die [³⁵S]GTPγS-Bindung an GST-RhoA (0,6 μM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Mono-FL (0,4 μM). Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der noch an RhoA gebundenen Radioaktivität nach der entsprechenden Inkubationszeit im Vergleich zur initialen Bindung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

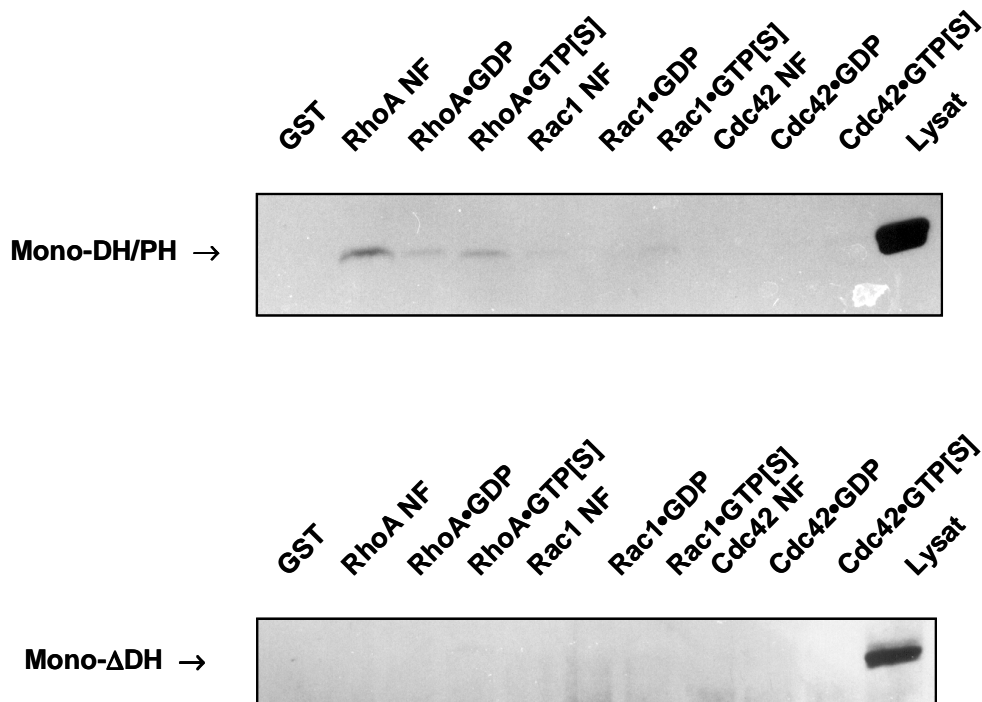
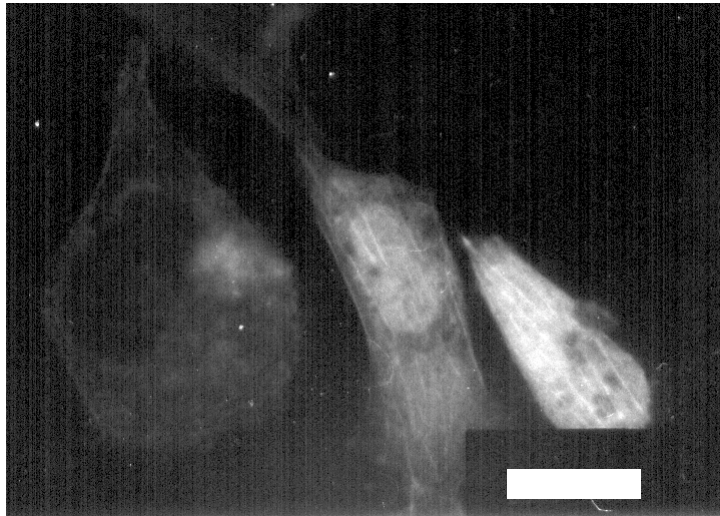


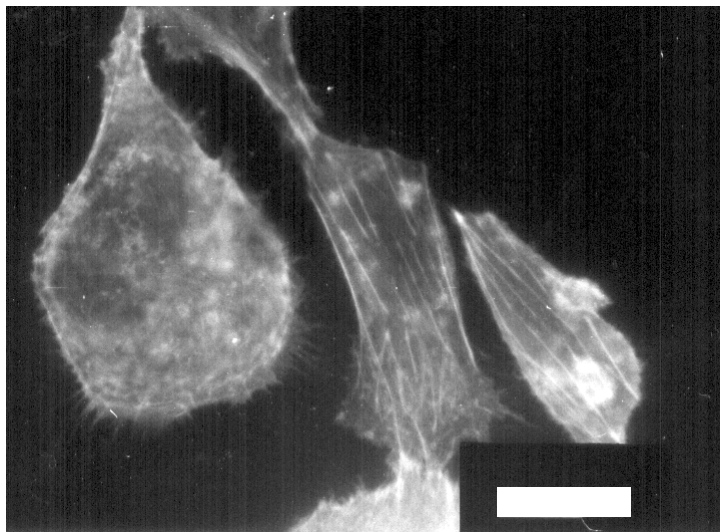
Abbildung 21: Interaktion von Mono mit Rho-GTPasen. Die Untersuchung der Interaktion der rekombinanten Proteine von GST, GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42 mit c-Myc fusioniertem und in HEK293-Zellen exprimiertem Mono-FL (**A**) und Mono-ΔDH (**B**) wurde wie unter "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt. Die Rho-GTPasen waren hierbei wie angegeben entweder im Nukleotid-freien (NF), GDP-gebundenen oder GTP γ S-gebundenen Zustand. Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde gebundenes Mono-FL bzw. Mono-ΔDH mit Hilfe eines Maus-Anti-c-Myc-Antikörpers im Westernblot detektiert.

Abbildung 22: Expression von Mono in J82-Zellen und Untersuchung der Auswirkungen auf das Aktin-Cytoskelett. Nach transienter Transfektion von J82-Zellen mit Mono-FL (10 µg / 5 ml in einem Culture Slide) wurde das Aktin-Cytoskelett mit TRITC-Phalloidin angefärbt (oberes Bild), wobei die in transfizierten Zellen exprimierten c-Myc-Epitop-markierten Proteine von Mono-FL unter Verwendung eines Anti-c-Myc-Antikörpers mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurden (unteres Bild). Das gezeigte Ergebnis, d.h. das Aktin-Cytoskelett der dargestellten Zelle, ist charakteristisch für das gesamte Experiment und wurden in mehreren gleichen Versuchen bestätigt.

TRITC-Phalloidin-Färbung



Anti-c-Myc-Antikörper- Darstellung



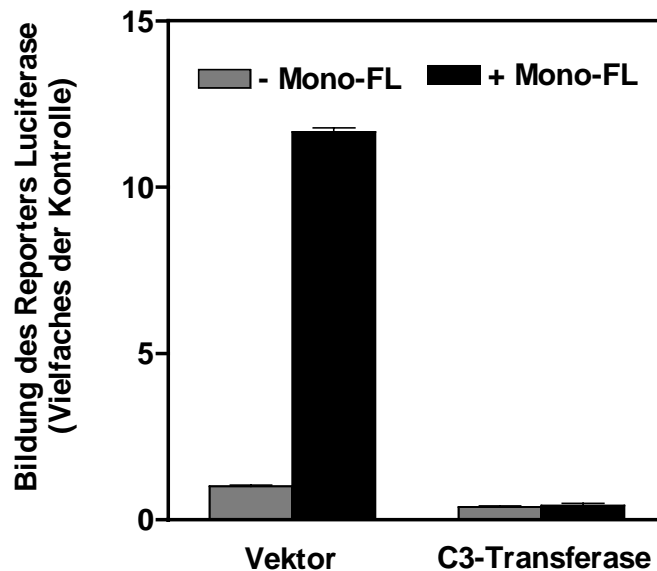
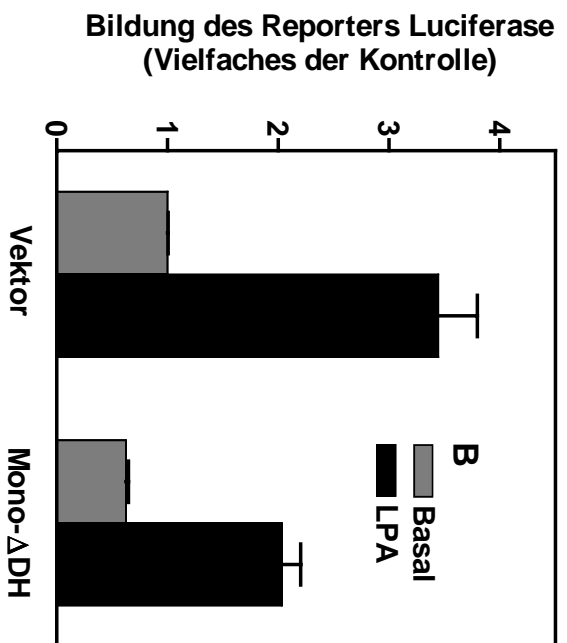
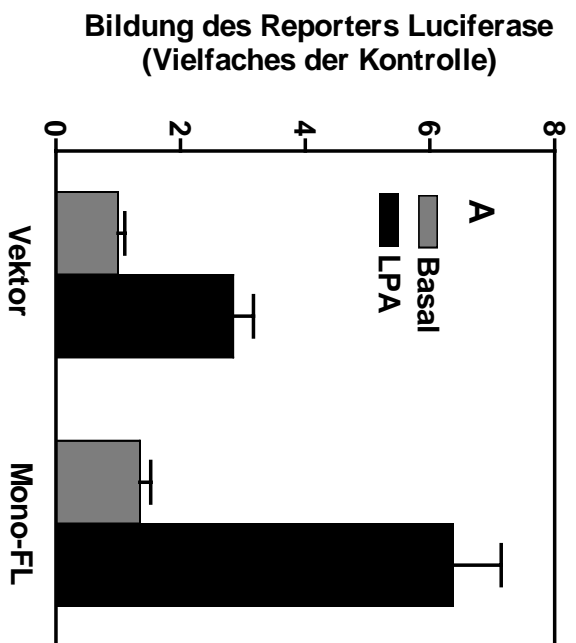


Abbildung 23: Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription Mono-FL. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Mono-FL (0,5 µg/Brunnen) oder C3-Transferase aus (1 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der vom Reporterplasmid pSRE.L gebildeten Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Aktivität der vom Kontroll-Reporters pRL-TK gebildeten Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

Abbildung 24: Einfluß von Mono-FL und Mono- Δ DH auf die Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch LPA. HEK293-Zellen mit M₂ mAChR wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 μ g/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 μ g/Brunnen) ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Mono-FL (0,1 μ g/Brunnen) (**A**) oder Mono- Δ DH (1 μ g/Brunnen) (**B**) kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit von 10 μ M LPA kultiviert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten, unstimulierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.



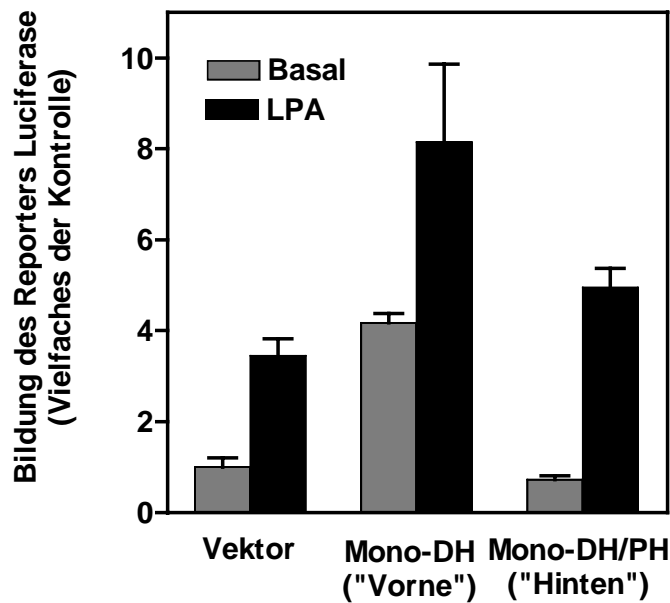
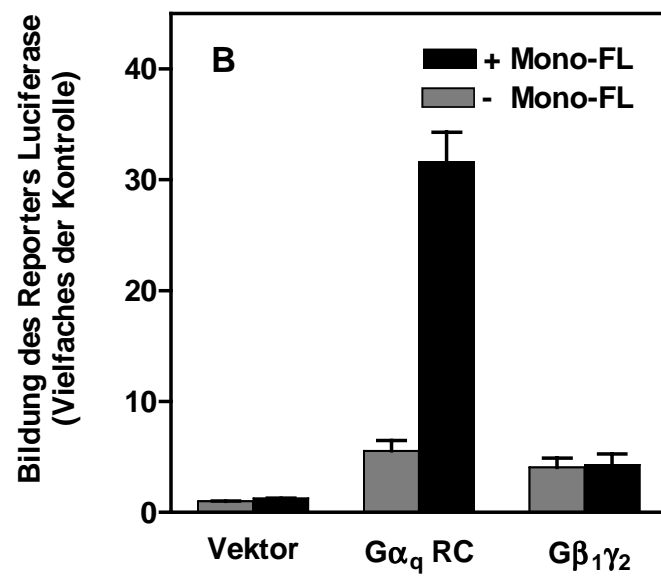
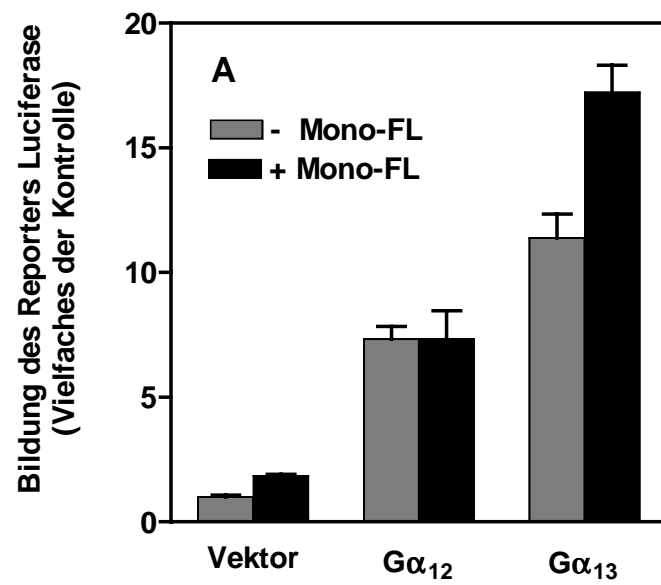


Abbildung 25: Einfluß der Konstrukte Mono-DH und Mono-DH/PH auf die Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch LPA. HEK293-Zellen mit M_2 mAChR wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen) ohne oder mit den Expressionsplasmiden der Konstrukte Mono-DH (vorderer Molekülteil von Mono-FL, 0,1 µg/Brunnen) oder Mono-DH/PH (hinterer Molekülteil von Mono-FL, 0,1 µg/Brunnen) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit von 10 µM LPA kultiviert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten, unstimulierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

Abbildung 26: Einfluß von Mono-FL und Mono-ΔDH auf die Stimulation der Gentranskription durch verschiedene α-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Gα₁₂, Gα₁₃ oder konstitutiv aktivem Gα_q (Gα_q RC) (jeweils 0,5 µg/Brunnen), in Ab- oder Anwesenheit der Expressionsplasmide von Mono-FL (0,1 µg/Brunnen) (**A**) oder Mono-ΔDH (0,05 µg/Brunnen) (**B**) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte ± S.D. eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.



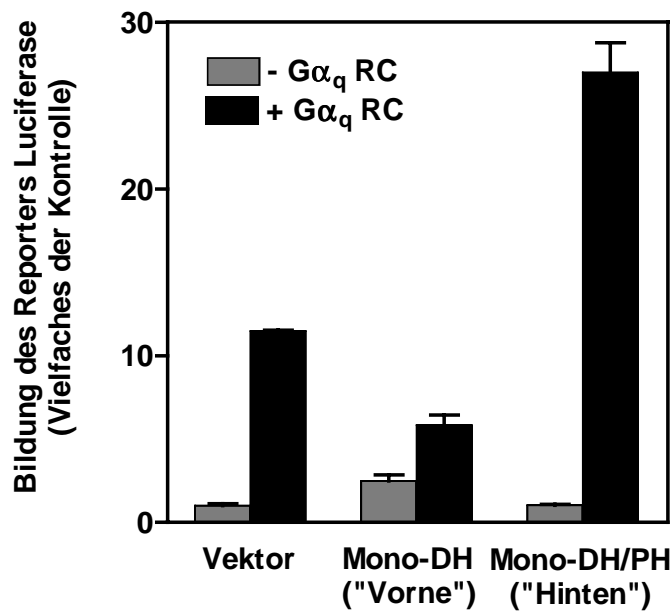


Abbildung 27: Einfluß der Konstrukte Mono-DH und Mono-DH/PH auf die Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch $G\alpha_q$ RC. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden der Konstrukte Mono-DH (vorderer Molekülteil von Mono-FL, 0,1 µg/Brunnen) oder Mono-DH/PH (hinterer Molekülteil von Mono-FL, 0,1 µg/Brunnen), in An- oder Abwesenheit des Expressionsplasmids von $G\alpha_q$ RC (0,05 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

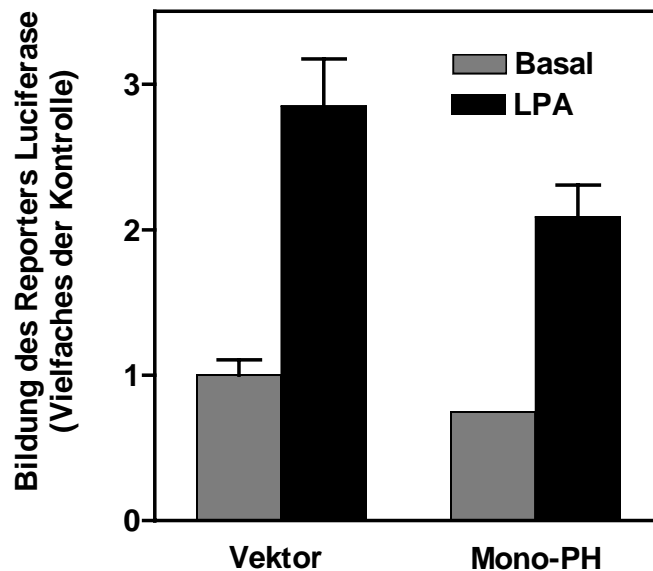


Abbildung 28: Hemmung der durch LPA stimulierten SRF-vermittelten Gentranskription durch Mono-PH. HEK293-Zellen mit M₂ mAChR wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen) in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von Mono-PH (1 µg/Brunnen) kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit von 10 µM LPA kultiviert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten, unstimulierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

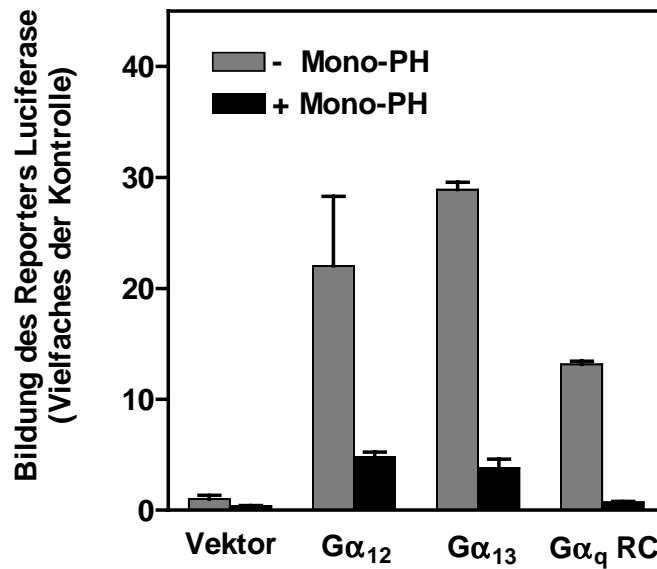


Abbildung 29: Einfluß von Mono-PH auf die Stimulation der Gentranskription durch verschiedene α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 μ g/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 μ g/Brunnen), in Ab- oder Anwesenheit des Expressionsplasmids von Mono-PH (1 μ g/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von Gα₁₂, Gα₁₃ oder konstitutiv aktivem Gα_q (Gα_q RC) (0,05 μ g/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

3.3 Charakterisierung eines neuen Guaninnukleotid-Austauschfaktors der Dbl-Familie mit deutlich abweichender Struktur

Bei weiteren Recherchen in verschiedenen Datenbanken aus Protein- und DNA-Sequenzen auf der Suche nach neuen, potentiellen Rho-GEFs wurden wir auf die cDNA und abgeleitete Proteinsequenz von KIAA0337 (GenBank® accession number AB002335) besonders aufmerksam, da es zwar die für die katalytische Aktivität verantwortliche DH-Domäne besitzt, ihm aber die PH-Domäne fehlt und es also nicht das für alle bisher gefundenen Rho-GEFs typische Tandem aus beiden Domänen aufweist. Auch die cDNA dieses bis dahin nicht funktionell näheruntersuchten Proteins wurde im Rahmen der Entschlüsselung des menschlichen Genoms vom Kazusa-DNA-Forschungsinstitut kloniert und uns von diesem zur Charakterisierung zur Verfügung gestellt. Hierbei war besonders die Fragestellung interessant, ob KIAA0337 trotz seiner strukturellen Andersartigkeit ebenfalls als Rho-GEF aktiv sein und somit einen erster Vertreter einer neuen Untergruppe der Dbl-Familie darstellen würde. Die 6289 Basenpaare lange cDNA von KIAA0337 zeigte einen offenen Leserahmen zwischen den Nukleotiden 455 und 4987, woraus sich ein Protein aus 1510 Aminosäuren ableitete mit einer errechneten molekularen Masse von 164 kDa (Abb. 30A).

Untersuchungen der Sequenz des abgeleiteten Proteins auf weitere bekannte Struktur motive ergaben, daß KIAA0337 neben der DH-Domäne zwischen den Aminosäuren 520 und 706 "nur" noch eine Prolin-reiche Region zwischen den Aminosäuren 1437 und 1443 besitzt. Beim Sequenzvergleich der DH-Domäne mit denen anderer Proteine zeigte KIAA0337 mit 50 %, 48 %, 45 % und 37 % die größten Homologien zu den DH-Domänen von Vav-3, Bcr, Ect-2 und FGD-1 (Abb. 30C). Während Vav-3 Rac1 und Cdc42 aktiviert, handelt es sich bei FGD-1 um ein für Cdc42 spezifisches GEF. Für Bcr wurde gezeigt, daß die isolierte DH-Domäne den Nukleotid-Austausch an RhoA, Rac1 und Cdc42 stimulierte. Das Protein Ect-2 scheint sogar katalytisch inaktiv zu sein und stellt "nur" einen Bindungspartner für die GTPasen Rho und Rac dar. Diese Befunde ließen daher keine Vorhersagen auf eine potentielle Aktivität und Spezifität von KIAA0337 zu.

Zur weiteren funktionellen Untersuchung von KIAA0337 klonierten wir die ungekürzte cDNA, KIAA0337-FL, sowie verschiedene Fragmente (KIAA0337-ΔC,

KIAA0337-ΔN und KIAA0337-ΔN2) in den eukaryonten Expressionsvektor pCMV-Tag3, um seine Aktivität in intakten Zellen untersuchen zu können (Abb. 30A). Für die Klonierung der Vollänge von KIAA0337 wurde die cDNA zunächst als *NcoI/KpnI*-Fragment (bp 453-782) und *KpnI/NotI*-Fragment (bp 782-6289) aus dem Klonierungsvektor pBlueskript ausgeschnitten und in die Schnittstellen *NcoI* und *NotI* des Baculovirus-Transfervektors pAcGHLT-B kloniert. Diese Zwischenklonierung ermöglichte nun das Ausschneiden der cDNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Schnittstelle vorne in der "Multiple cloning site") (bp 453-5357) und das Umsetzen in den mit *EcoRI* linearisierten Vektor pCMV-Tag3C. Die C-terminal verkürzte Form KIAA0337-ΔC wurde durch Ligation des entsprechenden *EcoRI/PvuII*-Fragments (bp 453-3030) in den mit *EcoI* und *EcoRV* geschnittenen Vektor pCMV-Tag3C erhalten. Bei der Klonierung der bis zur DH-Domäne N-terminal verkürzten Variante KIAA0337-ΔN wurde der mit *XhoI* linearisierte Vektor pCMV-Tag3B verwendet. Als Insert diente das aus KIAA0337-FI in pCMV ausgeschnittene *XhoI/XhoI* (Schnittstelle in der "Multiple cloning site")-Fragment (bp 1802-5357). Schließlich wurde aus diesem Konstrukt ein weiter verkürztes Fragment mit *BamHI* und *XhoI* (bp 2430-5357) ausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pCMV-Tag3C kloniert, wodurch KIAA0337-ΔN2 erhalten wurde, eine Variante, die lediglich den C-Terminus ohne DH-Domäne umfaßte. Wie der für alle durchgeführten Experimente beispielhafte Westernblot in Abb. 30B zeigt, konnten die exprimierten Proteine im Lysat der transfizierten Zellen mit Hilfe eines Anti-c-Myc-Antikörpers bei den erwarteten Größen eindeutig detektiert werden.

Um die humane Gewebeverteilung (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas) von KIAA0337 zu untersuchen wurde wiederum ein Northern Blot durchgeführt. Wir konnten ein Transkript von etwa 9 kb Länge detektieren, welches recht dominant im Herzen und nur sehr schwach in Plazenta und Niere auftrat. KIAA0337 scheint somit das erste GEF zu sein, welches vorwiegend und recht spezifisch im Herzen exprimiert wird (Abb. 31).

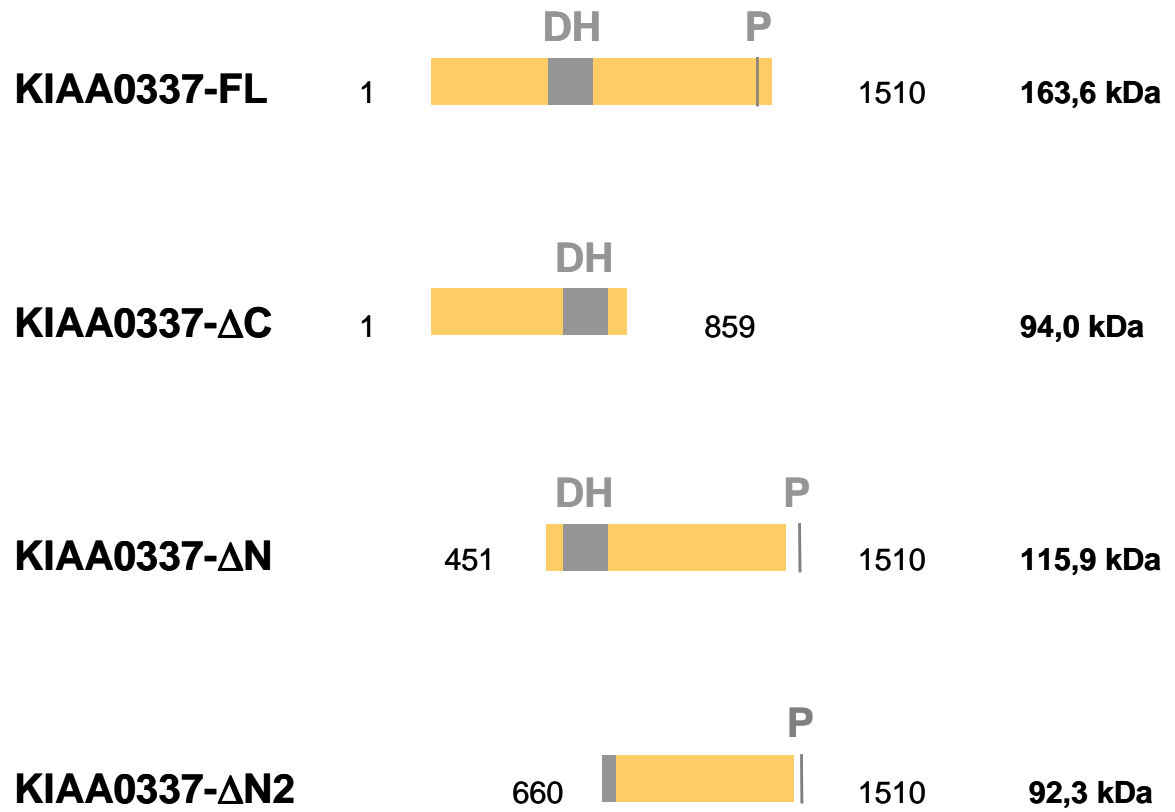
Um KIAA0337 biochemisch zu charakterisieren, untersuchten wir als nächstes seine potentielle Guaninnukleotid-Austauschaktivität und Spezifität gegenüber verschiedenen Mitgliedern der Rho-Familie. Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-fusionierter Proteine der C-terminal verkürzten Variante, KIAA0337-ΔC, wurde wiederum das Baculovirus/Sf9-System verwendet. Wir erhielten das hierzu notwendige Konstrukt im

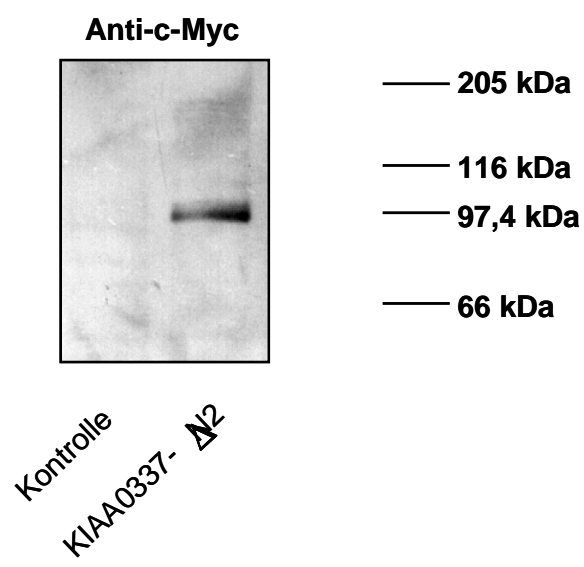
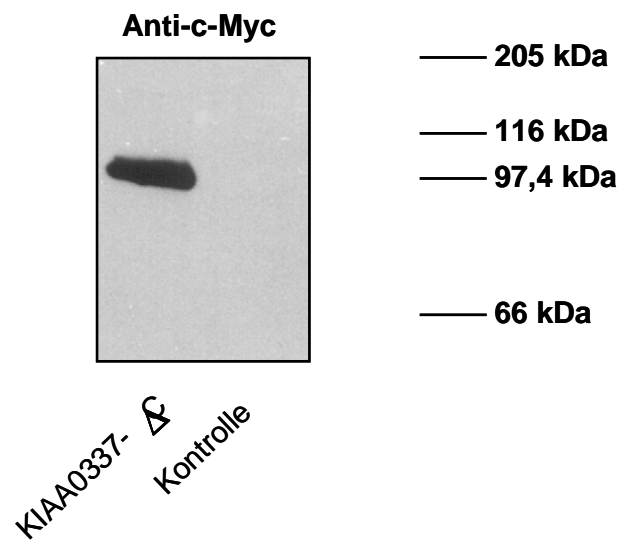
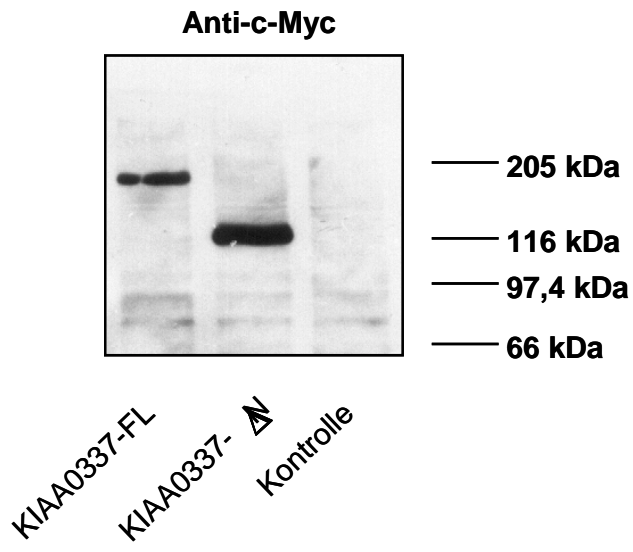
Baculovirus-Transfervektor durch Klonierung des bereits zuvor verwendeten *EcoRI/PvuII*-Fragments (bp 453-3030) in den mit *EcoRI* und *SmaI* geschnittenen Vektor pAcGHLT-B. Das über Glutathion-Sepharose aus den Sf9-Zellen aufgereinigte Protein konnte nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie-Blau bei einem Molekulargewicht von etwa 124 kDa (entspricht ~ 94 kDa KIAA0337- Δ C + ~ 30 kDa GST) nachgewiesen werden (Abb. 32). Wie die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abb. 33 zeigt, stimulierte GST-KIAA0337- Δ C deutlich die Freisetzung von [3 H]GDP aus gereinigtem GST-RhoA. Halbmaximale und maximale Freisetzungsraten von [3 H]GDP aus RhoA wurden dabei bereits bei "nur" subäquimolaren Mengen von KIAA0337- Δ C (0,2 μ M bzw. \geq 0,4 μ M) beobachtet. Dagegen zeigte KIAA0337- Δ C keine GEF-Aktivität für GST-Rac1 oder GST-Cdc42. Die Halbwertszeit der [3 H]GDP-Dissoziation von RhoA wurde in Anwesenheit von KIAA0337- Δ C im Vergleich zur Kontrolle verringert (Abb. 34A). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen der [3 H]GDP-Freisetzung stimulierte KIAA0337- Δ C die Bindung von [35 S]GTP γ S an RhoA (Abb. 34B). Diese Befunde belegten eindeutig, daß KIAA0337 trotz seiner strukturellen Andersartigkeit ein Rho-spezifischer Austauschfaktor ist.

Schließlich exprimierten wir das Protein ganzer Länge, KIAA0337-FL, sowie die N- bzw. C-terminal verkürzten Formen KIAA0337- Δ N und KIAA0337- Δ C in HEK293-Zellen und untersuchten deren potentiell über Rho vermittelte SRF- und SRE-abhängige Aktivierung der Gentranskription in intakten Zellen. Während die Expression von KIAA0337-FL auch bei Transfektion großer Mengen an Plasmid-DNA die Bildung des Reporters Luciferase nicht stimulierte, wurde die Gentranskription durch die beiden Mutanten deutlich auf das 2- bis 4-fache steigerte. Der stimulierende Effekt der Expression dieser Mutanten wurde, wie hier nur für KIAA0337- Δ N gezeigt, durch die Koexpression von C3-Transferase vollständig aufgehoben (Abb. 35). Diese Befunde lassen demnach darauf schließen, daß KIAA0337 als Protein ganzer Länge durch einen intramolekularen Hemmechanismus *per se* inaktiv ist und diese Hemmung durch eine intramolekulare Interaktion von N- und C-Terminus bedingt sein könnte, da das Fehlen eines dieser Termini zu einer konstitutiven Aktivität von KIAA0337 führte. Um diese Theorie zu bestätigen, untersuchten wir in einem *in vitro*-Versuch die Interaktion der N- und C-Termini von KIAA0337, indem wir den N-Terminus von KIAA0337, also KIAA0337- Δ C, als GST-Fusionsprotein mit Hilfe rekombinanter Baculoviren in Sf9-Zellen exprimierten, an Glutathion-Sepharose-"Beads" banden und mit

dem Lysat von HEK293-Zellen, die den mit dem c-Myc Epitop fusionierten C-Terminus von KIAA0337 ohne DH-Domäne, KIAA0337- Δ N2, exprimierten, inkubierten. Tatsächlich interagiert der C-Terminus KIAA0337- Δ N2 nur mit den "Beads", an die zuvor GST-KIAA0337- Δ C gebunden worden war (Abb. 36). Auch hemmt die Koexpression von KIAA0337- Δ N2, welches aufgrund der fehlenden DH-Domäne *per se* inaktiv war und die Bildung des Reporters Luciferase nicht stimuliert, deutlich die durch KIAA0337- Δ C erhöhte Luciferase-Bildung, in Übereinstimmung mit der Vorstellung einer intramolekularen Hemmung der katalytischen Aktivität von KIAA0337 bei Interaktion von N- und C-Terminus (Abb. 37).

Abbildung 30: Struktur des Proteins KIAA0337: Schematische Darstellung der zur Funktionsanalyse exprimierten Proteine und Nachweis im Westernblot; Vergleich der homologen Domänen mit anderen bekannten Rho-GEFs. A: Das Protein von KIAA0337 besitzt die für alle Rho-GEFs typischen DH-Domäne sowie eine prolinreiche Region (P). Zur Funktionsanalyse dienten neben dem Protein ganzer Länge (KIAA0337-FL) die Konstrukte KIAA0337- Δ C, KIAA0337- Δ N und KIAA0337- Δ N2. Angegeben sind jeweils die erste und letzte Aminosäure sowie das berechnete Molekulargewicht. **B:** Zum Nachweis der Expression von KIAA0337 und seinen Konstrukten in transfizierten HEK293-Zellen wurden Lysate dieser Zellen (jeweils 50 μ g Protein) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Hilfe eines Anti-c-Myc-Antikörpers detektiert. **C:** Homologien der DH-Domäne von KIAA0337 (AS 520-706) zu den entsprechenden Sequenzen der Rho-GEFs VAV-3, Bcr, Ect2 und FGD1. Identische bzw. homologe Aminosäuren aus einer der funktionell ähnlichen Gruppen [hydrophobe Reste (I, V, L, M), aromatische Reste (F, W, Y), saure Reste (D, E), basische Reste (K, R), ungeladen-polare Reste (N, Q)] sind schwarz unterlegt dargestellt.

A

B

C

DH-Domäne

KIAA0337 (Mensch) (520-706)	TLLDTEQSYV	ESLRTLMOGY	M-QPLKQP--	ENSV--LCDP	SLVDEIFDQI
VAV-3 (Mensch) (199-369)	EIKQTEEEKYT	ETLESIEKYF	M-APLKR---	-----FLTA	AEEFDSVFINI
Bcr (Mensch) (505-689)	GILASEETYL	SHLEALLLP-	M-KPLKAA--	ATTSQPVLT	QQIETIFFKV
Ect2 (Maus) (284-471)	ELYQTESNYV	NILATIIQLF	Q-VPLEEEGQ	RGGP--ILAP	EEIKTIFGSI
FGD1 (Mensch) (380-563)	ELLQTEKAYV	SRLHLLDQVF	CARLLEEA--	RNRS--SFP	DVVHGFISNI
KIAA0337 (Mensch) (520-706)	PELLEHHEQF	L-EQVRHCOM	TWHAQQKVGA	LLVQSFSKDV	LVNTIYSAYID
VAV-3 (Mensch) (199-369)	PELVKLHRNL	M-QEIHDSIV	NKN-DONLYQ	VFINYKERLV	IYGQYCSGVE
Bcr (Mensch) (505-689)	PELYEIHKEF	Y-DGLFPRVQ	QWSHQORVGD	LFQKLASQ--	-LGVYRAFVD
Ect2 (Maus) (284-471)	PDIFDVHMKI	K-DDLEDLIA	NWDESRSIGD	IFLK-YAKD-	LVKTYPPFVN
FGD1 (Mensch) (380-563)	CSIYCFHQQF	LLPELEKRM	EWDRYPRIGD	ILQKLAP---	FLKMYGEYVK
KIAA0337 (Mensch) (520-706)	NFLNAKDAVR	VAKEARPAFL	KFLEQ-SMRE	NK-E-----	KQALSDLMIK
VAV-3 (Mensch) (199-369)	SAISSLDYIS	KIKE--DVKL	KLEEC-SKRA	NN-G-----	KETLRDLLVV
Bcr (Mensch) (505-689)	NYGVAMEMAE	KCCQANAQFA	EISENLRARS	NK-DAKDPTT	KNSLETLLYK
Ect2 (Maus) (284-471)	FFEMSKEMII	KCEKQKPRFH	AFLKI-NQAK	PECG-----	RQSLVELLIR
FGD1 (Mensch) (380-563)	NFDRAVELVN	TWTERSTQFK	VIIHE-VQKE	EACG-----	NLTLQHMHLE
KIAA0337 (Mensch) (520-706)	PVQRIPRYEL	LVKDLLKHT-	-PEDHPDHPL	LLEAORNKQ	VAERINKGVR
VAV-3 (Mensch) (199-369)	PMQRVLYHL	LLQELVKHTT	DPTEKANLKL	ALDA---MKD	LAQYVN---
Bcr (Mensch) (505-689)	PVDRVTRSTL	VLHDLKHT-	-PASHPDHPL	LQDALRISQ	FLSSIN---
Ect2 (Maus) (284-471)	PVQRLPSVAL	LLNDLKHT-	-ADENPDKST	LEKAIGSLKE	VMTHINEDKR
FGD1 (Mensch) (380-563)	PVQRIPRYEL	LLKDYLLKL-	-PHGSPDSK-	--DAQSLLEL	IATAAEHSNA
KIAA0337 (Mensch) (520-706)	SAE				
VAV-3 (Mensch) (199-369)	---				
Bcr (Mensch) (505-689)	---				
Ect2 (Maus) (284-471)	KTE				
FGD1 (Mensch) (380-563)	AIR				

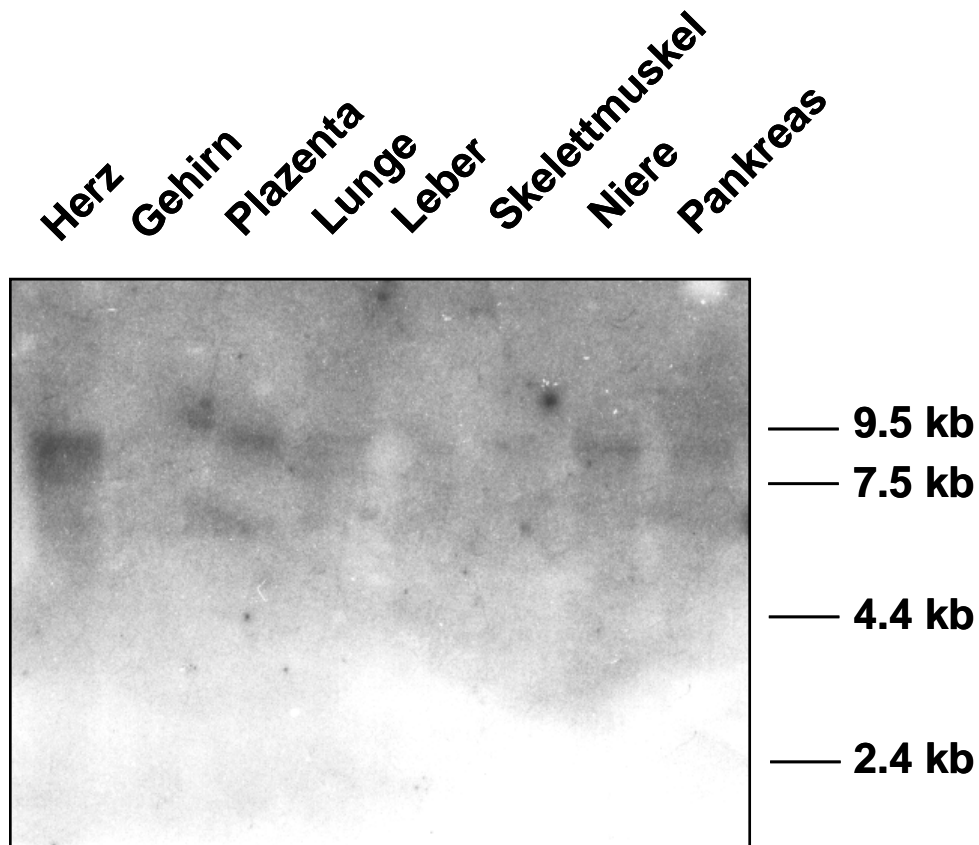


Abbildung 31: Gewebeverteilung von KIAA0337. Zur Hybridisierung eines Northern Blots aus poly(A)⁺ RNA, welche aus den angegebenen humanen Geweben isoliert wurde, wurde eine [α -³²P]-dCTP-markierte cDNA-Probe einer Teilsequenz von KIAA0337 (Nukleotide 944-1289) verwendet. Dargestellt ist das Autoradiogramm.

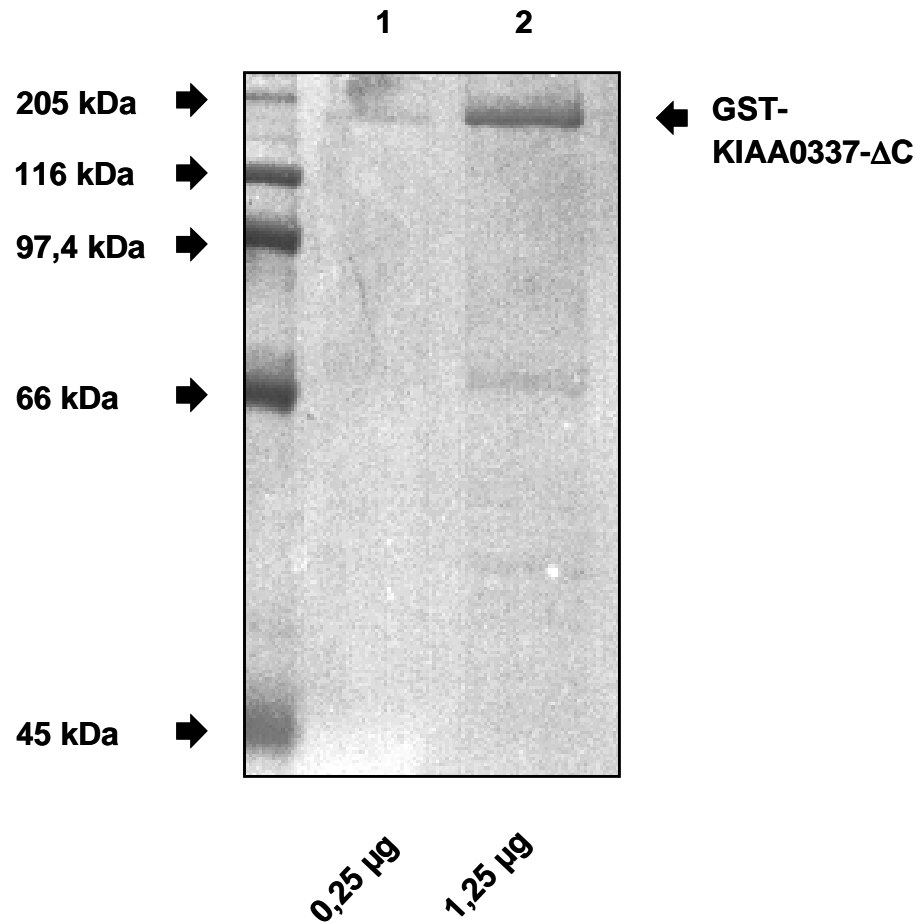


Abbildung 32: Expression von KIAA0337-ΔC mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in und Aufreinigung des Proteins aus Sf9-Insektenzellen. Das mit GST fusionierte Protein KIAA0337-ΔC wurde mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus in Sf9-Insektenzellen exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Das Protein wurde auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches im Anschluß an die Elektrophorese mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Angegeben sind jeweils die aufgetragenen Proteinmengen sowie die Größen des Proteinstandards.

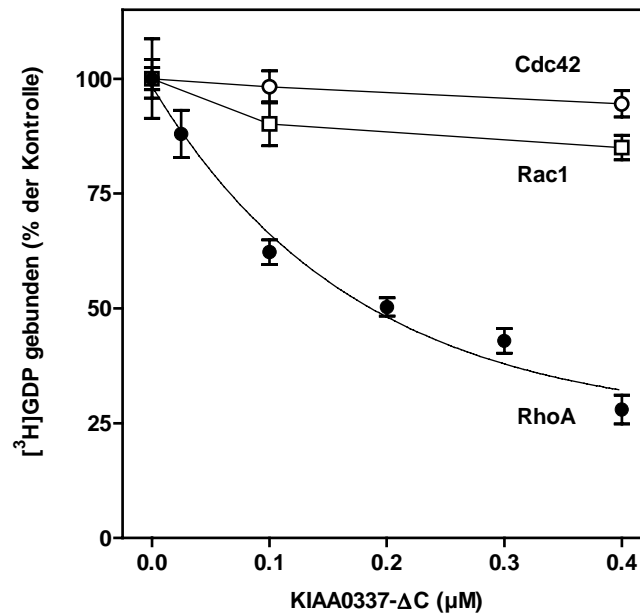
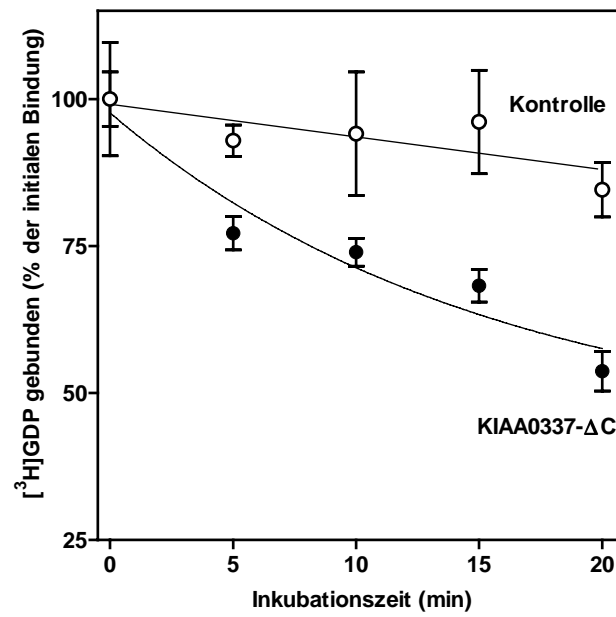
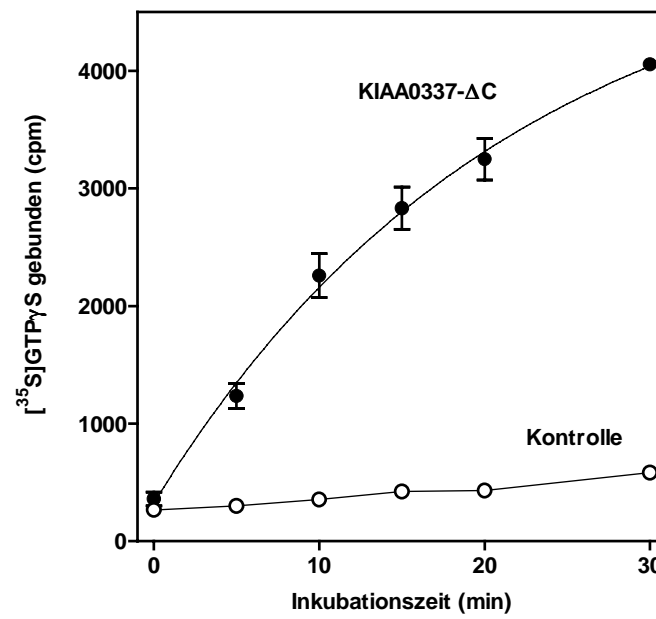


Abbildung 33: Charakterisierung der Guaninnukeotid-Austauschaktivität von KIAA0337-ΔC gegenüber Rho-GTPasen. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von gereinigtem rekombinantem GST-KIAA0337-ΔC auf die Freisetzung von [^3H]GDP aus GST-RhoA, Rac1 und Cdc42 (jeweils 0,6 μM) nach einer Inkubationszeit von 40 min bei RT. Die Menge an Protein-gebundenem [^3H]GDP wurde nach Filtration über eine Nitrocellulosemembran durch Szintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der noch an den Rho-GTPasen gebundenen Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit von KIAA0337-ΔC. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

Abbildung 34: Zeitverläufe der RhoA-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschaktivität von KIAA0337-ΔC. **A:** Zeitverlauf der Dissoziation von [^3H]GDP aus GST-RhoA (0,6 μM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von GST-KIAA0337-ΔC (0,3 μM). Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der noch an RhoA gebundenen Radioaktivität nach der entsprechenden Inkubationszeit im Vergleich zur initialen Bindung. **B:** Messung der Bindung von [^{35}S]GTPγS an GST-RhoA (0,6 μM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von KIAA0337-ΔC (0,3 μM). Die gezeigten Daten in Abbildung A und B sind Mittelwerte \pm S.D. von 4-fach-Bestimmungen eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei weiteren Experimenten erhalten.

A**B**

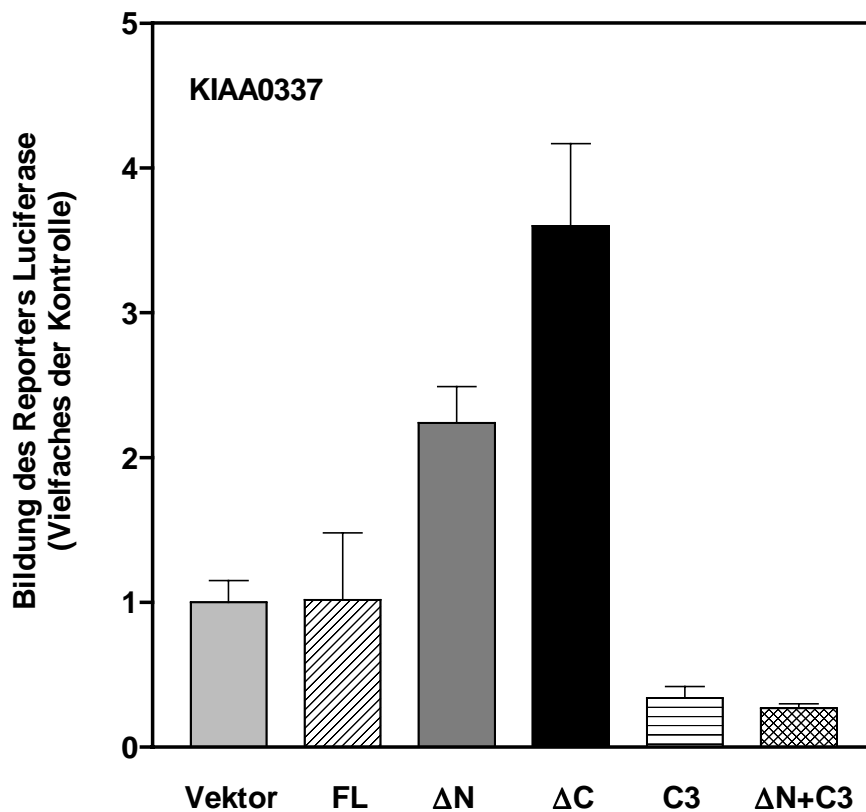


Abbildung 35: Stimulation der SRF-vermittelten Gentranskription durch verschiedene Konstrukte von KIAA0337. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Kontroll-Reporter pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit den Expressionsplasmiden von KIAA0337-FL (FL), KIAA0337-ΔN (ΔN), KIAA0337-ΔC (ΔC), C3 Transferase (C3) oder KIAA0337-ΔN zusammen mit C3 Transferase (ΔN+C3) (jeweils 1 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte ± S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

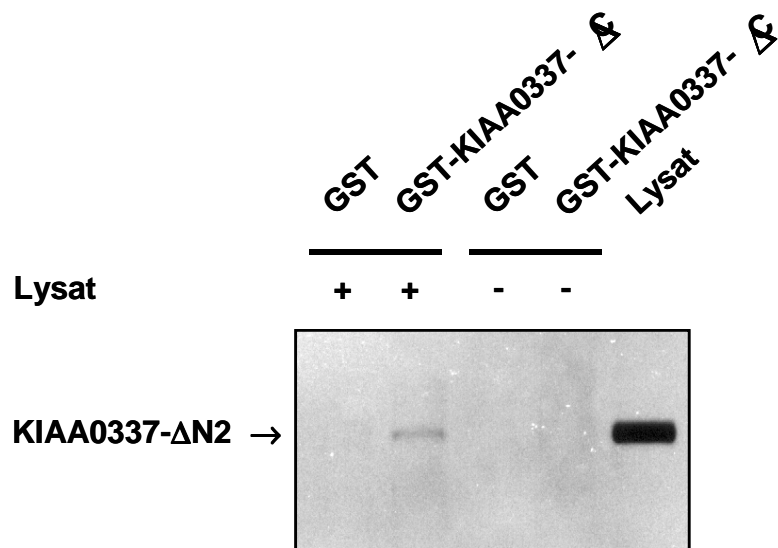


Abbildung 36: Interaktion des N- und C-Terminus von KIAA0337. Die Untersuchung der Interaktion des in Sf9-Zellen exprimierten GST oder GST-Fusionsproteins von KIAA0337-ΔC mit c-Myc fusioniertem und in HEK293-Zellen exprimiertem KIAA0337-ΔN2 wurde wie unter "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde gebundenes KIAA0337-ΔN2 mit Hilfe eines Maus-Anti-c-Myc-Antikörpers detektiert.

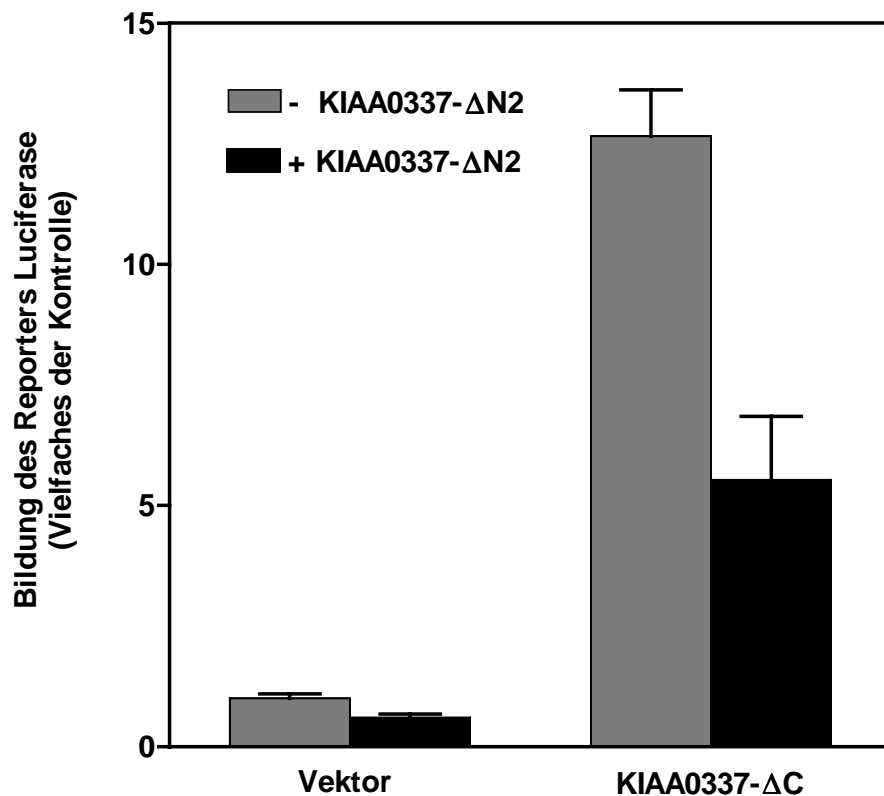


Abbildung 37: Hemmung der durch den N-Terminus KIAA0337-ΔC stimulierten SRF-vermittelten Gentranskription durch Koexpression des C-Terminus KIAA0337-ΔN2. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid pSRE.L (Expression von Luciferase aus dem Leuchtkäfer, 0,5 µg/Brunnen) und dem Plasmid des Kontroll-Reporters pRL-TK (Expression von Luciferase aus *Renilla*, 0,1 µg/Brunnen), ohne oder mit dem Expressionsplasmid von KIAA0337-ΔC (0,5 µg/Brunnen), in Ab- oder Anwesenheit von KIAA0337-ΔN2 (0,5 µg/Brunnen) kotransfiziert. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer wurde auf die Bildung der Luciferase aus *Renilla* bezogen. Die gezeigten Daten der Luciferase-Bildung sind Mittelwerte \pm S.D. von 3-fach-Bestimmungen eines Experimentes, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung in mit leerem Expressionsvektor transfizierten Kontroll-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

4. Diskussion

Kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse, wie der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts, dem Zellwachstum oder der Gentranskription. Dabei sind die Signalwege und molekularen Mechanismen, die durch extrazelluläre Liganden über die Besetzung membranständiger Rezeptoren zur Aktivierung dieser GTPasen führen, noch weitgehend unbekannt. Da die Aktivierung von Rho-Proteinen vermutlich vor allem durch die Wirkung entsprechender Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) stimuliert wird, wenn auch andere Möglichkeiten der Regulation, z.B. über GAPs oder GDIs, existieren, galt das Interesse innerhalb dieser Arbeit der Identifizierung und Charakterisierung neuer, unbekannter GEFs für Rho-GTPasen. Die mittlerweile relativ große Zahl (~30) der Mitglieder der Familie der Rho-GEFs verdeutlicht die wichtige Funktion der Rho-Proteine innerhalb der Zelle, wobei die Aufklärung der genauen Rolle jedes einzelnen GEFs bei der Signaltransduktion und der Zellregulation zum Teil jedoch noch weiterer Untersuchungen bedarf. Angestrebtes Ziel war es, weitere Rho-GEFs aufzufinden und zu charakterisieren und somit einen umfangreicheren Überblick über die funktionellen Mechanismen dieser Regulatoren und ihr Vorkommen in verschiedenen menschlichen Geweben zu gewinnen, was letztendlich vielleicht eine Klassifizierung dieser Proteine in verschiedene Untergruppen ermöglichen könnte. Wir nutzten hierzu die Tatsache, daß alle bislang beschriebenen Austauschfaktoren für Rho-Proteine eine nach dem ersten Vertreter Dbl benannte und für die katalytische Aktivität verantwortliche "Dbl homology" (DH)-Domäne besitzen. Die cDNA des transformierenden Onkogens Dbl wurde ursprünglich aus einem humanen B-Zell-Lymphom isoliert (Eva & Aarason, 1985). Beim Durchsuchen verschiedener DNA- und Protein-Datenbanken mit der Sequenz der DH-Domäne verschiedener bekannter Rho-GEFs erschienen uns zunächst die Sequenzen von KIAA0521 und KIAA0337 interessant, deren cDNAs im Rahmen der Entschlüsselung des menschlichen Genoms vom japanischen Kazusa-DNA-Forschungsinstitut gefunden und uns zur Verfügung gestellt wurden (Suyama *et al.*, 1999). Des weiteren konnten wir eine neue humane cDNA für ein bislang unbekanntes Protein mit großen Homologien zu Rho-GEFs durch Homologie-Klonierungen aus einer humanen embryonalen Gehirn-cDNA-Bibliothek isolieren, das wir Mono nannten (siehe unten). Während der funktionellen

Untersuchungen des von uns neu klonierten, potentiellen GEFs Mono ergaben weitere Datenbankrecherchen, daß die cDNA-Sequenz von Mono weitestgehend mit der bislang nicht beschriebenen Sequenz CSB5 übereinstimmt, welches im Dezember 1998 von der Firma Smithkline Beecham patentiert wurde.

Untersuchungen der cDNA-Sequenzen dieser drei potentiell neuen Austauschfaktoren für Rho-GTPasen auf offene Leserahmen ergaben zunächst, daß es sich um vollständig klonierte Proteine handelte. So kodierte die cDNA von KIAA0521 für ein Protein mit 1015 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 114 kDa, das wir dementsprechend p114-Rho-GEF nannten. Das aus dem offenen Leserahmen von KIAA0337 abgeleitete Protein mit 1510 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 164 kDa war dagegen deutlich größer. Die von uns klonierte cDNA kodierte schließlich für ein Protein mit "nur" 580 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 64 kDa. Wie die anderen GEFs der Dbl-Familie wiesen auch diese potentiellen GEFs somit große Unterschiede bezüglich ihrer Proteingröße auf (Cerione & Zheng, 1996).

Sowohl p114-Rho-GEF als auch Mono zeigten wie alle bekannten Mitglieder der Dbl-Familie das typische Strukturmotiv aus DH- und benachbarter PH-Domäne. Zusätzlich wies p114-Rho-GEF noch eine C-terminal gelegene prolinreiche Region auf, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln könnte. Mono zeigte keine weiteren Domänen. Abweichend von der Struktur der bisher gefundenen Rho-GEFs besaß KIAA0337 nicht das typische Tandem aus DH- und PH-Domäne, sondern zeigte lediglich die DH-Domäne, nicht jedoch die PH-Domäne. Des weiteren besaß KIAA0337 wie p114-Rho-GEF eine Prolin-reiche Region im hinteren Molekülteil.

Der Sequenzvergleich der DH- und PH-Domäne von p114-Rho-GEF mit den entsprechenden Domänen der bekannten Rho-GEFs ergab die größten Homologien zu den Rho-spezifischen GEFs p190 RhoGEF (Gebbink *et al.*, 1997; van Horck *et al.*, 2001), Lbc (Zheng *et al.*, 1995) und Lfc (Glaven *et al.*, 1996). Dagegen war die Ähnlichkeit zu Austauschfaktoren, die spezifisch Rac1 oder Cdc42 aktivieren, wie Tiam1 (Michiels *et al.*, 1995) bzw. FGD1 (Zheng *et al.*, 1996b), und solchen, die sowohl auf Rho als auch auf Cdc42 wirken, wie Dbl (Hart *et al.*, 1994) und Ost (Horii *et al.*, 1994), nur gering, so daß aufgrund der Sequenz eine Spezifität von p114-Rho-GEF für Rho zu vermuten war. Trotz fast identischer molekularer Masse wies p114-Rho-GEF jedoch nur sehr geringe Homologien zu

p115 RhoGEF auf, einem anderen Rho-spezifischen GEF (Hart *et al.*, 1996).

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Mono mit den Sequenzen der bekannten Rho-GEFs zeigte in der DH- und PH-Domäne die größten Homologien zu dem Rho-spezifischen, C-terminalen Tandem aus DH- und PH-Domäne (Trio D2) von Trio, welches so benannt wurde, da es neben dem homologen noch ein weiteres, N-terminales Tandem aus DH- und PH-Domäne mit Rac-spezifischer GEF-Aktivität (Trio D1) sowie eine Protein-Serin-/Threonin-Kinase-Domäne, also insgesamt drei verschiedene Domänen, besitzt (Debant *et al.*, 1996). Eine enge strukturelle Ähnlichkeit zu Trio weist auch das kürzere Protein Duo auf, welches seinen Namen vermutlich aufgrund des Vorhandenseins nur einer DH-Domäne und einer PH-Domäne, also zweier Domänen, enthielt und dessen DH/PH-Tandem innerhalb der DH-Domäne eine sehr hohe Homologie zur Rac1-spezifischen GEF-D1-Domäne in Trio zeigt (Colomer *et al.*, 1997). Da das aus der neuen, von uns klonierten cDNA abgeleitete Protein neben dem Tandem aus DH- und PH-Domäne ebenfalls keine weiteren Domänen besaß, haben wir es entsprechend "Mono" genannt. Obwohl Mono auch eine relativ große Homologie von etwa 60 % innerhalb der DH-Domäne zu den auf Rho und Cdc42 wirkenden Austauschfaktoren Dbp und Ost zeigte, legte die sehr große Ähnlichkeit (88 %) der Sequenz dieser Domäne zur Rho-spezifischen DH-Domäne von Trio nahe, daß es sich bei Mono, wie bei p114-Rho-GEF, um einen Austauschfaktor für Rho handeln könnte.

Aus der Untersuchung der Homologien der DH-Domäne von KIAA0337 mit anderen Proteinen bzw. DH-Domänen ließ sich dagegen zunächst keine Vorhersage über eine mögliche Aktivität und Spezifität von KIAA0337 gegenüber Rho-GTPasen treffen. Die größte Ähnlichkeit (50 %) ergab sich zur DH-Domäne von Vav-3, einem neuen Mitglied der Vav-Familie, welches bei Überexpression in NIH 3T3-Fibroblasten Rac1 und Cdc42 aktiviert (Zeng *et al.*, 2000). Weitere zu KIAA0337 homologe Austauschfaktoren waren Bcr, Ect-2 und FGD-1 mit 48 %, 45 % und 37 % Ähnlichkeit, welche sehr unterschiedliche Spezifitäten gegenüber Rho-Proteinen aufweisen. Während es sich bei Bcr um einen multifunktionellen Regulator handelt, der sowohl eine DH- und PH-Domäne als auch eine GAP-Domäne enthält, wobei die DH-Domäne auf RhoA, Rac1 und Cdc42 wirkt (Chuang *et al.*, 1995), stellt FGD-1 einen spezifisch auf Cdc42 wirkendes GEF dar (Olson *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996b). Dagegen bindet Ect-2 zwar an RhoC und Rac1, besitzt gegenüber diesen GTPasen jedoch keine GEF-Aktivität (Miki *et al.*, 1993).

Aufgrund der fehlenden PH-Domäne könnte es sich bei KIAA0337 um einen ersten Vertreter einer neuen Untergruppe der Dbl-Familie handeln, da alle bisher in der Literatur beschriebenen GEFs der Dbl-Familie ausnahmslos eine zur DH-Domäne C-terminal benachbarte PH-Domäne besitzen (Cerione & Zheng, 1996; Whitehead *et al.*, 1997; Stam & Collard, 1999). Die Annahme der Existenz einer solchen Untergruppe wird auch durch die Sequenz KIAA0294 (GenBank® accession number AB002292) und KIAA1010 (GenBank® accession number AB023227) unterstützt, die wie KIAA0337 "nur" eine DH-Domäne aber keine benachbarte PH-Domäne aufweisen, bislang jedoch noch nicht funktionell charakterisiert wurden. PH-Domänen wurden in vielen verschiedenen Signalmolekülen gefunden (Musacchio *et al.*, 1993) und vermitteln wahrscheinlich Protein/Protein- und/oder Protein/Lipid-Interaktionen (Lemmon *et al.*, 1996). Obwohl die DH-Domäne *in vitro* notwendig und hinreichend für die GEF-Aktivität ist (Hart *et al.*, 1994), schrieb man dem Vorhandensein der PH-Domäne eine essentielle, funktionelle Bedeutung *in vivo* zu. Die möglicherweise durch die PH-Domäne von Dbl und anderer GEFs vermittelte subzelluläre Lokalisation dieser Proteine könnte für die selektive Aktivierung von Rho-Proteinen in verschiedenen zellulären Kompartimenten verantwortlich sein. Im Falle von Lbc und Dbl scheint die Lokalisation dieser GEFs am Cytoskelett durch die PH-Domäne für ihre onkogene Aktivität notwendig zu sein (Olson *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1996a), während bei Lfc die PH-Domäne für die Lokalisation an der Plasmamembran und damit für das transformierende Potential entscheidend ist (Whitehead *et al.*, 1995a). Im Fall von Lfc führte die Entfernung der PH-Domäne zu einem Verlust der transformierenden Aktivität dieses GEFs, welche durch Anfügen der Plasmamembran-bindenden Domäne der GTPase H-Ras rekonstituiert werden konnte, und somit die Vermutung bestätigte, daß die PH-Domäne für die Lokalisation an der Plasmamembran und die damit verbundene zelluläre Funktion von Lfc notwendig ist (Whitehead *et al.*, 1995a). Da KIAA0337 trotz seiner Größe neben der DH-Domäne, abgesehen von der Prolin-reichen Region im hinteren Molekülteil, keine weiteren bekannten Strukturmotive besitzt, könnten Interaktionen von KIAA0337 mit anderen zellulären Regulatoren oder Effektoren zum einen über die Prolin-reiche Region oder aber über andere bisher unbekannte strukturelle Einheiten im N- oder C-Terminus des Moleküls erfolgen.

Datenbankrecherchen ergaben, daß sich das Gen für Mono drei PAC-Klonen zuordnen läßt, die auf Chromosom 12 kartiert wurden. Das Gen für KIAA0337 wurde

ebenfalls auf drei PAC-Klonen identifiziert, die auf Chromosom 11q13 bzw. 11q14 kartiert wurden. Schließlich fanden wir, daß das Gen für p114-Rho-GEF auf Chromosom 19 lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt).

Die bekannten Rho-GEFs weisen bezüglich ihres Expressionsmusters in verschiedenen Geweben und Zelllinien sehr große Unterschiede auf, wobei die Expression einiger GEFs ubiquitär, anderer jedoch recht gewebespezifisch zu sein scheint. Die Northern Blot-Analyse der Expression von Mono in verschiedenen humanen Geweben ergab, daß dieses Protein sehr dominant im Gehirn und weitaus schwächer auch im Herzen exprimiert wird (Transkript von etwa 3,3 kb Länge). Dagegen konnten wir in Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas kein Signal detektieren. Auch der homologe, möglicherweise auf Rac1 wirkende Austauschfaktor Duo zeigt eine Gehirn-spezifische Expression (Colomer *et al.*, 1997), ebenso wie das Cdc42-spezifische GEF hPEM-2 (Reid *et al.*, 1999), und das erst kürzlich identifizierte, zu hPEM-2 sehr homologe potentielle GEF Collybistin (Kins *et al.*, 2000).

Die Untersuchung der Expression von KIAA0337 in verschiedenen humanen Geweben zeigte, daß KIAA0337 recht gewebespezifisch exprimiert wird. Wir konnten im Northern Blot ein Transkript von etwa 9 kb Länge recht dominant im Herzen, dagegen sehr viel schwächer in Plazenta, Lunge und Niere nachweisen. Keine Signale erhielten wir in Gehirn, Leber, Skelettmuskel und Pankreas. KIAA0337 scheint also wie Mono in humanen Geweben recht unterschiedlich exprimiert zu werden, und es stellt das erste GEF dar, das recht spezifisch vorwiegend im Herzen vorkommt. Weiter unterstützt wurde die vorwiegende Expression von KIAA0337 im Herzen durch Untersuchungen des Vorkommens von mRNA von KIAA0337 in aus verschiedenen humanen Geweben erhaltener RNA mit Hilfe des sogenannten "RNase protection assay" in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Wieland, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg. Hierbei wurde die Expression der mRNA von KIAA0337 in den humanen Geweben Herz, Leber, Cortex und Myometrium semiquantitativ bestimmt (Daten nicht gezeigt). Wie zuvor im Northern Blot konnte auch in diesem Versuch eine deutlich höhere Expression von KIAA0337 im Herzen im Vergleich zu den anderen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Angesichts dieser Ergebnisse untersuchten wir, ob im gesunden Herzen verglichen mit dem insuffizienten Herzen möglicherweise Unterschiede der

Expression von KIAA0337 auftraten. Beim semiquantitativen Vergleich des Gehaltes an mRNA für KIAA0337, welche zum einen aus gesunden humanen Herzen und zum anderen aus Herzen von Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie isoliert wurde, wurden allerdings keine signifikanten Veränderung der Expression von KIAA0337 im gesunden im Vergleich zum geschädigten Herzen detektiert (Daten nicht gezeigt).

Zu der Gruppe von ubiquitär vorkommenden GEFs scheint auch p114-Rho-GEF zu gehören, ebenso wie die Rho-spezifischen GEFs Lfc (Whitehead *et al.*, 1995a) und Lsc (Whitehead *et al.*, 1996). Im Northern Blot konnten wir ein Transkript von etwa 6,4 kb Länge mit unterschiedlicher Intensität in allen untersuchten Geweben nachweisen. Die stärksten Signale konnten wir dabei in Niere und Pankreas, schwächere Signale auch in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber und Skelettmuskel detektieren. Das Auftreten eines zusätzlichen kürzeren Transkripts von ca. 3,9 kb Länge im Skelettmuskel könnte auf die Expression einer Spleißvariante von p114-Rho-GEF in diesem Gewebe hindeuten. Die Erzeugung von (-/-) Knockout-Mäusen der drei neuen GEFs könnte weiter interessante Hinweise auf ihre mögliche funktionelle Bedeutung *in vivo* liefern.

Mit spezifischen Oligonukleotiden konnten wir mittels RT-PCR die endogene Expression von Mono in den von uns verwendeten HEK293-, nicht aber in J82-Zellen nachweisen. Obwohl die Bildung von mRNA zwar nicht zwingend mit der tatsächlichen Bildung des entsprechenden Proteins gleichzusetzen ist, lassen diese Befunde die Vermutung zu, daß Mono in Abhängigkeit vom zellulären Entwicklungsstadium zwar in embryonalen Nierenzellen der Zelllinie HEK293- nicht jedoch, wie der Northern Blot zeigte, in adulten Nierenzellen vorkommt. Mittels reverser Transkription und PCR konnten wir Transkripte für KIAA0337 und p114-Rho-GEF sowohl in HEK-293 als auch in J82-Zellen detektieren.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde für die Austauschfaktoren Lbc, Lfc, Lsc, mNET1, Trio D2 und KIAA0380 gezeigt, daß sie *in vitro* in der Lage waren, spezifisch RhoA zu aktivieren (Zheng *et al.*, 1995; Glaven *et al.*, 1996; Debant *et al.*, 1996; Alberts & Treisman, 1998; Rümenapp *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu waren andere Proteine mit katalytischer DH-Domäne in der Lage, mehrere verschiedene GTPasen zu aktivieren: onkogenes Dbl und Ost stimulierten den Nukleotidaustausch an RhoA und Cdc42, während Abr, Bcr und Tiam1 RhoA, Rac1 und Cdc42 aktivierten. (Hart *et al.*, 1994; Horii *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 1995; Michiels *et al.*, 1995). Um die drei neuen, potentiellen GEFs auf ihre

Guaninnukleotid-Austauschaktivität und ihre Spezifität gegenüber verschiedenen GTPasen der Rho-Familie *in vitro* funktionell zu charakterisieren, untersuchten wir in weiteren Studien sowohl die Stimulation der Freisetzung von gebundenem [^3H]GDP aus Rho-GTPasen durch das jeweilige rekombinante, aus Sf9-Insektenzellen aufgereinigte Protein als auch den Austausch von GDP gegen GTP durch Messung der Bindung des stabilen GTP-Analogons [^{35}S]GTP γ S an Rho-GTPasen. Weder p114-Rho-GEF noch Mono oder KIAA0337 hatten einen Einfluß auf die Freisetzung von [^3H]GDP aus Rac1 oder Cdc42. Dagegen konnten wir zeigen, daß alle drei GEFs konzentrationsabhängig in der Lage waren, die Freisetzung von gebundenem [^3H]GDP aus RhoA zu stimulieren. Auch weitere Untersuchungen des zeitlichen Verlaufes der Freisetzung von [^3H]GDP aus RhoA und der Bindung von [^{35}S]GTP γ S an RhoA zeigten eine deutliche Stimulation des GDP/GTP-Austausches in Anwesenheit des jeweiligen GEFs. Da bei allen Versuchen die zu untersuchenden GEFs im Vergleich zu RhoA nur in subäquimolaren Mengen eingesetzt wurden, handelt es sich hierbei um katalytische Reaktionen. Diese Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen belegten bereits eindeutig, daß es sich bei p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 um Rho-spezifische Austauschfaktoren handelt. In Übereinstimmung mit unserem Befund wurde während unserer Untersuchungen an KIAA0337 von einer anderen Arbeitsgruppe darüber berichtet, daß das aufgereinigte GST-Fusionsprotein der DH-Domäne, von diesen Autoren als DH337 bezeichnet, gleichermaßen den GDP/GTP-Austausch spezifisch an RhoA katalysierte (De Toledo *et al.*, 2000). Somit scheinen die Rho-GEFs p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 *in vitro* sehr spezifisch RhoA zu aktivieren.

Für einige Mitglieder der Dbl-Familie konnte gezeigt werden, daß sie an Rho-Proteine binden, an denen sie jedoch keinen Nukleotidaustausch katalysieren. Der für RhoA und Cdc42 spezifische Austauschfaktor Ost interagiert nur mit dem GTP-gebundenen Zustand von Rac1, was die Möglichkeit nahelegte, daß Ost einen Effektor von Rac darstellt (Horii *et al.*, 1994). Zudem scheint es bei der Interaktion der Rho-GEFs mit den kleinen GTPasen, an denen sie den Nukleotidaustausch beschleunigen, sehr unterschiedliche Spezifitäten bezüglich des Zustands an gebundenem Nukleotid zu geben, und somit tragen diese Untersuchungen zum Verständnis des Mechanismus der Aktivierung von Rho-GTPasen bei. Beispielsweise interagierten die Rho-spezifischen GEFs Lfc, Lsc und Lbc mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA, nicht jedoch mit dem GDP- oder GTP γ S-gebundenen

Zustand, in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß Rho-GEFs den Nukleotid-freien Zustand der GTPasen stabilisieren (Hart *et al.*, 1994; Glaven *et al.*, 1996). Dagegen konnte gezeigt werden, daß ein anderes RhoA-spezifisches GEF, mNET1, gleichermaßen an GDP- oder GTP γ S-gebundenes RhoA bindet, die Bindung von mNET1 an den Nukleotid-freien Zustand wurde nicht untersucht (Alberts & Treisman, 1998). KIAA0380, welches ebenfalls den Nukleotidaustausch spezifisch an Rho katalysierte, interagierte am stärksten mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA und zeigte zusätzlich eine deutlich schwächere Bindung an GTP γ S-gebundenes, jedoch keine Bindung an GDP-gebundenes RhoA (Rümenapp *et al.*, 1999). GEF-H1, ein GEF für Rho und Rac, interagierte mit RhoA und Rac1, unabhängig vom Zustand des gebundenen Nukleotids, was den Befund unterstützt, daß der GDP/GTP-Austausch an RhoA durch GEF-H1 nicht katalytisch zu sein scheint (Ren *et al.*, 1998). Schließlich war Ect2 zwar in der Lage, an RhoA, RhoC und Rac1 zu binden, besaß jedoch keine GEF-Aktivität für diese GTPasen (Miki *et al.*, 1993). Dies legt nahe, daß die DH-Domäne in einigen Fällen "nur" als Bindungsmotiv dient. Wir untersuchten daher zum einen die Nukleotid-Zustände von RhoA, an die p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 binden, und zum anderen die mögliche Interaktion dieser GEFs mit Rac1 und Cdc42, obwohl wir zuvor zeigen konnten, daß diese GEFs auf den GDP/GTP-Austausch dieser GTPasen keinen Einfluß hatten (siehe oben). Die Beobachtung, daß p114-Rho-GEF mit dem Nukleotid-freien, nicht aber mit dem GDP-gebundenen Zustand von RhoA interagierte, war in guter Übereinstimmung mit seiner zuvor nachgewiesenen Austauschaktivität gegenüber RhoA. Dagegen deutete die starke Bindung von p114-Rho-GEF an GTP γ S-gebundenes RhoA auf eine zusätzliche Funktion als Effektor oder "Carrier" von aktiviertem RhoA hin. Keine Bindung von p114-Rho-GEF konnten wir an Rac1 oder Cdc42, in keinem der drei untersuchten Zustände an gebundenem Nukleotid, detektieren. Zur Untersuchung der Interaktion von Mono mit den kleinen GTPasen der Rho-Familie verwendeten wir das N-terminal verkürzte Konstrukt Mono-DH/PH. Wir konnten eine Bindung von Mono-DH/PH an alle drei untersuchten Zustände von RhoA, nicht jedoch an Rac1 oder Cdc42 nachweisen. Dabei erfolgte die stärkste Interaktion mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA, was wiederum in guter Übereinstimmung mit dem postulierten Modell der Rho-Aktivierung durch Rho-GEFs und dem zuvor gezeigten Guaninnukleotid-Austausch an RhoA ist. Gleiche Ergebnisse erhielten wir auch bei der Untersuchung der Interaktion des Proteins ganzer Länge,

Mono-FL, mit den Rho-GTPasen (Daten nicht gezeigt). Auch für den RhoA spezifischen Austauschfaktor p190 RhoGEF wurde vor kurzem ein ähnliches Bindungsverhalten gegenüber Rho-GTPasen beschrieben (van Horck *et al.*, 2000). Schließlich konnten wir zeigen, daß die innerhalb der DH-Domäne deletierte und offenbar katalytisch inaktive Mutante Mono- Δ DH (siehe unten) im Gegensatz zum Wildtyp von Mono nicht mehr in der Lage war, an die GTPase RhoA zu binden. Daher scheint die DH-Domäne von Mono für die Bindung der GTPase RhoA essentiell zu sein, so wie dies auch für andere DH-Domänen bzw. GEFs beschrieben wurde. In Untersuchungen der Interaktion von KIAA0337 mit den drei Rho-GTPasen ergab sich, daß KIAA0337 nur an RhoA, nicht jedoch an Rac1 oder Cdc42 bindet, und daß diese Interaktion wie bei den Rho-spezifischen GEFs Lfc, Lsc und Lbc nur mit dem Nukleotid-freien Zustand von RhoA, nicht aber mit dem GDP- oder GTP γ S-gebundenen Zustand zu beobachten war (Burkhard Wittinghofer, pers. Mitteilung). Zusammengefasst konnten wir somit in diesen *in vitro*-Versuchen zeigen, daß p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 Rho(A)-spezifische GEFs sind, die zudem selektiv mit Rho(A) interagieren.

Erste Hinweise auf eine Wirkung der neuen GEFs auf Rho-GTPasen, auch in intakten Zellen, sollten Untersuchungen der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts nach Überexpression dieser Rho-GEFs liefern. Bislang wurden die Signaltransduktionswege zur Aktivierung der Rho-Proteine durch die durch diese GTPasen hervorgerufenen typischen Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts in Swiss bzw. NIH 3T3-Fibroblasten untersucht (Hall, 1998). Für unsere Versuche haben wir ein anderes Zellsystem gewählt, nämlich Harnblasenkarzinomzellen der Linie J82, da diese ebenfalls aufgrund ihrer Größe gut für Darstellungen des Aktin-Cytoskeletts geeignet sind. Kontroll-Experimente in J82-Zellen mit konstitutiv aktiven Rho-GTPasen zeigten zunächst, daß die Expression von V14 RhoA die Ausbildung von Aktin-Streßfasern induzierte, während die Expression von V12 Rac1 zur Ausbildung von Lamellipodien führte (Rümenapp *et al.*, 1999), und die Effekte sich somit nicht von den in Swiss 3T3-Zellen beobachteten Veränderungen unterschieden. Wurde p114-Rho-GEF mittels transienter Transfektion in J82-Zellen überexprimiert, zeigten die transfizierten Zellen eine deutliche Ausbildung von Aktin-Streßfasern, jedoch keine Lamellipodien. Auch die Expression des endogen nicht in J82-Zellen exprimierten Mono führte zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern. Offenbar führt die Überexpression von p114-

Rho-GEF bzw. die Expression von Mono über die endogen vorkommenden Mengen hinaus dazu, daß eine Kontrolle dieser GEFs durch die Zelle nicht mehr möglich ist und endogenes Rho(A) aktiviert wird, mit der Folge, daß Streßfasern entstehen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen *in vitro* legte das Auftreten der für aktiviertes RhoA typischen Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts bei (Über-)Expression von p114-Rho-GEF und Mono in J82-Zellen nahe, daß beide GEFs auch *in vivo* zu einer Aktivierung von RhoA führen. Auch nach Überexpression von KIAA0337 konnten wir, wenn auch nur sehr schwach, die Ausbildung von Streßfasern beobachten (siehe unten).

In weiteren Studien haben wir dann zur quantitativen Erfassung der Aktivierung von Rho-Proteinen durch die neuen GEFs in intakten Zellen auch die Stimulation der Gentranskription über den Transkriptionsfaktor SRF bestimmt. So konnte zuvor gezeigt werden, daß RhoA, Rac1 und Cdc42 in der Lage sind, über SRF die Transkription von Genen zu stimulieren, die in ihren Promotoren die Regulatorsequenz SRE tragen (Hill *et al.*, 1995). Zudem wurde von einigen Arbeitsgruppen beschrieben, daß Rho-Proteine an der durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivierten, SRF-abhängigen Gentranskription beteiligt sind (Hill *et al.*, 1995; Fromm *et al.*, 1997). Für unsere Untersuchungen verwendeten wir ein Reporter-Konstrukt, welches die damit transfizierten Zellen unter der Kontrolle eines Promotors mit SRE.L, einem mutierten *c-fos* SRE, zur Expression des Enzyms Luciferase befähigt. Dieser mutierte *c-fos* Promotor kann nur über die Aktivierung von Rho-Proteinen stimuliert werden, da er zwar noch eine hochaffine Bindungsstelle für SRF besitzt, jedoch nicht in der Lage ist, den durch den Ras-Raf-ERK-Signaltransduktionsweg aktivierbaren "Ternary complex factor" zu binden (Hill *et al.*, 1995; Mao *et al.*, 1998a und b). In den von uns für diese Versuche verwendeten HEK293-Zellen, die stabil den M₃ mAChR und endogen eine Vielzahl anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, u.a. für LPA, exprimierten, konnten wir zunächst zeigen, daß die Expression von konstitutiv aktivem V14 RhoA zu einer SRF-abhängigen Stimulation der Gentranskription führte. Durch die Inkubation der von uns verwendeten HEK293-Zellen mit Carbachol oder LPA wurde die Bildung der Luciferase deutlich stimuliert. Beide Rezeptor-Stimulationen wurden durch die Koexpression von C3-Transferase, ein spezifischer Inaktivator von Rho(A-C), vollständig unterdrückt, wohingegen dominant negatives Rac1 oder Cdc42 keinen Einfluß auf diesen Effekt hatten (Daten nicht gezeigt; Rümenapp *et al.*, 2000). Diese Befunde sprechen somit für die spezifische

Beteiligung von Rho(A) an der Stimulation der Gentranskription durch die Rezeptoren in dem von uns untersuchten zellulären System.

Im folgenden untersuchten wir, ob p114-Rho-GEF in der Lage ist, Rho-Proteine zu aktivieren und dadurch die Gentranskription über SRF zu stimulieren. Ähnlich der Expression von konstitutiv aktivem V14 RhoA steigerte die Überexpression von p114-Rho-GEF in HEK 293-Zellen deutlich die SRF-abhängige Gentranskription. Während die zusätzliche Expression dominant negativer Mutanten von Rac1 und Cdc42 keinen Einfluß auf diesen stimulierenden Effekt von p114-Rho-GEF hatte, wurde die Bildung des Reporters Luciferase durch die Koexpression von C3-Transferase vollständig unterdrückt. Diese Ergebnisse unterstützten weiter unseren Befund, daß es sich bei p114-Rho-GEF um einen Rho-spezifischen Austauschfaktor handelt, und legten nahe, daß p114-Rho-GEF in intakten Zellen über die Aktivierung von Rho(A) die Gentranskription über SRF stimuliert. Möglicherweise wird das Molekül ganzer Länge von p114-Rho-GEF bei seinem Vorkommen in endogenen Mengen in der Zelle durch Interaktion mit anderen Proteinen inhibiert und bei starker Überexpression von p114-Rho-GEF fehlt offenbar dann dieser intermolekulare Hemmechanismus. Weitere Untersuchungen der SRF-vermittelten Gentranskription sollten nun zeigen, ob p114-Rho-GEF an der Aktivierung von Rho durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt ist. Dazu wurde p114-Rho-GEF in einem Maße überexprimiert, in dem es selbst nur eine geringe Bildung des Reporters Luciferase induziert. Bei der anschließenden Stimulation dieser Zellen mit LPA oder Carbachol wurde deutlich mehr Reporter Luciferase gebildet, als es der Summe der Stimulationen in Zellen entspricht, welche p114-Rho-GEF schwach überexprimierten oder welche nur mit LPA oder Carbachol stimuliert wurden. Dies bedeutet, daß ein synergistischer Effekt zwischen p114-Rho-GEF und LPA bzw. Carbachol bei der Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription existiert. Kein potenzierender oder additiver Effekt trat dagegen bei Zugabe von LPA oder Carbachol auf, wenn die Expression von p114-Rho-GEF das Zellsystem bereits maximal stimulierte (Daten nicht gezeigt). Wurde die innerhalb der DH-Domäne deletierte Variante p114- Δ DH zusammen mit dem Reporter-Konstrukt in HEK 293-Zellen exprimiert, so zeigte sich, daß diese Mutante im Gegensatz zu p114-Rho-GEF nicht mehr in der Lage war, die SRF-abhängige Gentranskription zu stimulieren. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Konzept, daß die DH-Domäne für die katalytische Aktivität eines GEFs gegenüber den kleinen GTPasen entscheidend ist, und man durch eine Deletion

innerhalb dieser Domäne eine katalytisch inaktive und möglicherweise dominant negative Mutante erhalten könnte (Zheng *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1997). Wir konnten beobachten, daß die Expression der Deletionsmutante p114- Δ DH die durch LPA oder Carbachol stimulierte Bildung des Reporters Luciferase um etwa 50 % hemmte. Zusammen mit dem Befund, daß LPA und Carbachol die Gentranskription über SRF synergistisch mit p114-Rho-GEF aktivieren, scheint somit p114-Rho-GEF an der Aktivierung von Rho durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zumindest bei der Aktivierung der Gentranskription, beteiligt zu sein. Der Befund, daß die durch LPA oder Carbachol stimulierte Gentranskription durch die gleichzeitige Koexpression von p114- Δ DH jedoch nicht vollständig gehemmt wurde, könnte auf die Existenz weiterer Signalwege von den Rezeptoren zur Aktivierung von Rho und der Gentranskription hindeuten. Schließlich untersuchten wir, über welche Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine die Aktivierung von p114-Rho-GEF erfolgen könnte. Die (Über-)Expression der Wildtypen und der konstitutiv aktiven QL-Mutanten von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ führt in HEK 293-Zellen ebenso wie die Expression der konstitutiv aktiven Mutante von $G\alpha_q$, $G\alpha_q$ RC, zu einer starken Stimulation der Bildung des Reporters Luciferase (Rümenapp *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die Stimulation der Luciferase-Bildung in HEK 293-Zellen durch LPA oder Carbachol in unserem Zellsystem gegenüber Pertussistoxin insensitiv ist (Daten nicht gezeigt), hatte die Expression der konstitutiv aktiven QL-Mutante von $G\alpha_{i2}$ keinen Effekt auf die Gentranskription. Auch in NIH 3T3-Fibroblasten aktivierten konstitutiv aktive Mutanten von $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$, nicht jedoch von $G\alpha_{i2}$, den Transkriptionsfaktor SRF über RhoA (Mao *et al.*, 1998a). Die Überexpression von $G\beta_1\gamma_2$ stimulierte die SRF-abhängige Gentranskription ebenfalls deutlich. Im folgenden untersuchten wir dann die Effekte der Koexpression von p114-Rho-GEF und der Deletionsmutante p114- Δ DH mit den α -Untereinheiten $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$ RC oder der $G\beta\gamma$ -Kombination $G\beta_1\gamma_2$. Überraschenderweise traten in Zellen, welche zum einen eine stimulierende α -Untereinheit ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ oder $G\alpha_q$ RC) oder die stimulierende $G\beta\gamma$ -Kombination $G\beta_1\gamma_2$ und zum anderen p114-Rho-GEF koexprimierten, keine synergistischen Effekte im Bezug auf die Luciferase-Bildung auf, trotz der zuvor beobachteten potenzierenden Effekte von p114-Rho-GEF und der Stimulation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für LPA oder Carbachol. Jedoch hemmte die Koexpression der Deletionsmutante p114- Δ DH sowohl die durch die drei G-Protein- α -Untereinheiten ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ oder $G\alpha_q$ RC) als auch die

durch $G\beta_1\gamma_2$ stimulierte Luciferase-Bildung, ähnlich wie sie auch die Effekte von LPA und Carbachol hemmte. Somit scheint jede der untersuchten G-Protein-Untereinheiten möglicherweise bei der Rho-abhängigen Aktivierung von p114-Rho-GEF eine Rolle zu spielen, und es ist in diesem Versuchssystem nicht möglich, eine klare Zuordnung zu den an der Stimulation dieses Rho-GEFs beteiligten G-Protein-Untereinheiten zu treffen.

Die Expression in HEK 293-Zellen und die anschließende Bestimmung der über SRF vermittelten Gentranskription unterstützten auch im Falle von Mono die Vorstellung, daß es sich bei diesem um einen spezifisch auf Rho wirkenden Austauschfaktor handelt. Wie zuvor für p114-Rho-GEF beschrieben, wurde auch durch die Koexpression von Mono(-FL) die Bildung des Reporters Luciferase stark stimuliert, und durch die zusätzliche Expression von C3-Transferase wurde dieser Effekt vollständig unterdrückt. Dominant negatives Rac1 und Cdc42 hatten dagegen keinen Einfluß auf den Effekt von Mono(-FL). Möglicherweise existiert also auch beim Vorkommen von Mono in endogenen Mengen in der Zelle ein intermolekularer Hemmechanismus, vermittelt durch die Interaktion von Mono mit anderen Proteinen, welcher bei starker Überexpression von Mono dann offenbar fehlt. Bei einer geringen Expression von Mono-FL, welche selbst kaum eine Wirkung auf die Gentranskription zeigte, und der anschließenden Inkubation der Zellen mit LPA trat zwischen Mono-FL und LPA ein synergistischer Effekt auf. Zusammen mit der Tatsache, daß die katalytisch inaktive Deletionsmutante Mono- Δ DH die durch LPA stimulierte Luciferase-Bildung etwa um 50 % unterdrückte, ließen diese Befunde darauf schließen, daß auch Mono an der Aktivierung von Rho durch den G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptor beteiligt ist. Da die Hemmung durch Mono- Δ DH nicht vollständig war, kann man annehmen, daß mehrere Signalwege und Rho-GEFs, zumindest aber p114-Rho-GEF und Mono, an der Rho-abhängigen Induktion der Gentranskription durch den LPA-Rezeptor beteiligt sind.

Durch die Expression der beiden Varianten von Mono, Mono-DH und Mono-DH/PH, denen entweder der C-Terminus ab der DH-Domäne oder der N-Terminus vor der DH-Domäne fehlt, versuchten wir, den strukturellen Molekülteil zu identifizieren, der für die Aktivierung von Rho nach Stimulation des LPA-Rezeptors essentiell ist. Der C-Terminus von Mono verhielt sich dabei ähnlich wie das Molekül ganzer Länge und steigerte bei einer geringen Expression den Effekt von LPA auf die Gentranskription synergistisch. Dagegen zeigte das C-terminal verkürzte Konstrukt *per se* eine konstitutive Aktivität und führte zu

einer im Vergleich zu Mono-FL deutlichen Steigerung der Gentranskription, die zu der Stimulation durch LPA additiv war. Angesichts dieser Befunde vermuteten wir, daß der C-Terminus von Mono als regulatorische Domäne fungiert, welche normalerweise die katalytische Aktivität von Mono unterdrückt und eine konstitutive Aktivität von p114-Rho-GEF möglicherweise durch Interaktion mit anderen Proteinen verhindert. Da im Gegensatz zum Molekül ganzer Länge zwischen dem N-Terminus von Mono und LPA kein synergistischer Effekt mehr auftrat, scheint die Aktivierung von Mono durch oberhalb gelegene Signale über den hinteren Molekülteil zu erfolgen, wobei vermutlich ein Aktivator durch Bindung an diese potentiell regulatorische Region die katalytische Funktion von Mono aktiviert. Auch für den Austauschfaktor Lbc wurde beschrieben, daß eine Verkürzung des C-Terminus des Proto-Onkogens, welcher sowohl die transformierenden Eigenschaften als auch die subzelluläre Lokalisation bestimmt, zu einer Aktivierung von Lbc führt (Sterpetti *et al.*, 1999). Dagegen werden Dbl, Ost, Net1 und Ect2 durch N-terminale Verkürzungen des Moleküls aktiviert (Ron *et al.*, 1988; Miki *et al.*, 1993; Horii *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1996). Eine ähnliche Regulation der GEF-Aktivität wurde auch für die Rho-spezifischen GEFs p115 RhoGEF und PDZ-RhoGEF beschrieben, welche beide in ihren N-Termini eine Domäne mit Homologien zu den RGS-Proteinen aufweisen. Die Beobachtungen, daß p115 RhoGEF über die N-terminale RGS-Domäne, welche GTPase-aktivierende Aktivität für $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ besitzt, direkt an diese beiden α -Untereinheiten bindet (Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998), und daß p115 RhoGEF spezifisch durch $G\alpha_{13}$ stimuliert wird und das Vorhandensein des N-Terminus von p115 RhoGEF hierbei entscheidend ist, legte nahe, daß p115 RhoGEF die durch $G\alpha_{13}$ induzierte Aktivierung von Rho über den N-terminalen Molekülteil vermittelt (Mao *et al.*, 1998a). Wie Untersuchungen der SRF-Aktivierung ergaben, wird PDZ-RhoGEF wahrscheinlich ebenfalls durch die N-terminal gelegene RGS-Domäne außerhalb der katalytischen Domäne negativ reguliert, wobei diese Domäne mit den G-Protein- α -Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ interagiert und somit die direkte Aktivierung von PDZ-RhoGEF durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln könnte (Fukuhara *et al.*, 1999). Bei der Untersuchung der Beteiligung heterotrimerer G-Protein- α -Untereinheiten an der Aktivierung von Mono beobachteten wir, daß die Koexpression der Deletionsmutante Mono- Δ HDH die durch alle drei Untereinheiten $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$ RC hervorgerufene Stimulation der Bildung des Reporters Luciferase hemmte. Die Koexpression von Mono-FL steigerte

jedoch synergistisch recht spezifisch nur die durch $G\alpha_q$ RC induzierte Gentranskription, während sie auf den Effekt von $G\alpha_{12}$ keinen und auf den Effekt von $G\alpha_{13}$ nur einen sehr geringen stimulierenden Einfluß hatte. Daher vermuteten wir, daß $G\alpha_q$, nicht aber $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, zu einer spezifischen Aktivierung von Mono führt. Die anschließende Untersuchung der beiden verkürzten Formen von Mono von Mono, Mono-DH und Mono-DH/PH, hinsichtlich ihres modulierenden Effektes auf die durch $G\alpha_q$ RC induzierte Gentranskription, war in Übereinstimmung mit den zuvor beobachteten Wirkungen auf die Stimulation durch LPA. Nur der C-Terminus von Mono, Mono-DH/PH, führte bei schwacher Koexpression, welche selbst kaum einen Effekt auf die Gentranskription hatte, zusammen mit $G\alpha_q$ RC zu einer synergistischen Steigerung der Bildung des Reporters Luciferase. Der N-Terminus von Mono, Mono-DH, wies wiederum *per se* eine konstitutive Aktivität auf. Im Vergleich zur Stimulation durch LPA, die zur Stimulation mit Mono-DH additiv war, hemmte Mono-DH hier sogar eher die Stimulation durch $G\alpha_q$ RC. Diese Daten legten also erneut nahe, daß der C-Terminus von Mono für die Regulation der GEF-Aktivität durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, vermutlich über $G\alpha_q$ vermittelt, essentiell ist. Diese Hypothese wird weiter durch die folgenden Tatsachen unterstützt: Erstens, neben Mono- Δ DH, welches nur innerhalb der DH-Domäne deletiert ist, jedoch noch den intakten N- und C-Terminus aufweist, reichte auch die Koexpression des äußersten C-Terminus von Mono, Mono-PH, aus, um die Stimulation der Gentranskription durch den LPA-Rezeptor zu hemmen. Zweitens, durch die Koexpression von Mono-PH wurde die durch alle drei Untereinheiten $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$ RC hervorgerufene Stimulation des Reporters Luciferase ebenso gehemmt wie durch die Koexpression von Mono- Δ DH.

Einen anderen Mechanismus der Aktivierung und Regulation der GEF-Aktivität konnten wir für KIAA0337 zeigen. Im Gegensatz zu p114-Rho-GEF und Mono führte die Expression des Moleküls ganzer Länge, KIAA0337-FL, nicht *per se* zu einer Steigerung der Bildung des Reporters Luciferase. Sowohl die Expression einer C-terminal verkürzten Form des Proteins, die nach der DH-Domäne endet, KIAA0337- Δ C, als auch einer Variante ohne den bis zur DH-Domäne deletierten N-Terminus, KIAA0337- Δ N, induzierte dagegen deutlich die Gentranskription. Die vollständige Unterdrückung des stimulierenden Effekts der beiden Deletionsmutanten auf die Gentranskription durch die Koexpression von C3-Transferase, legte erneut nahe, daß es sich bei KIAA0337 um ein Rho-spezifisches GEF handelt, welches

trotz fehlender PH-Domäne auch *in vivo* funktionell aktiv ist. Auch bei einer Expression der drei Formen von KIAA0337 in J82-Zellen und der Untersuchung ihrer Wirkung auf das Aktin-Cytoskelett ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Wie zuvor bereits erwähnt, führte die Expression von KIAA0337-FL nur zu einer sehr schwachen Ausbildung von Aktin-Streßfasern. Dagegen wurden Aktin-Streßfasern sehr massiv durch die Expression jeder der beiden Deletionsmutanten induziert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtungen vermuteten wir, daß das Protein ganzer Länge von KIAA0337 vielleicht durch einen intramolekularen Hemmechanismus *per se* inaktiv gehalten wird, und da sowohl das Fehlen des N- wie auch des C-Terminus zu einer Aktivierung führt, möglicherweise eine intramolekulare Interaktion von N- und C-Terminus diese Hemmung bewirkt. Abweichend von unseren Befunden in J82-Zellen berichteten De Toledo *et al.* (2000), daß es bei Expression des WT von KIAA0337 in REF-52 und Swiss 3T3-Fibroblasten zu einer deutlichen Ausbildung von Aktin-Streßfasern kam. Möglicherweise unterliegt KIAA0337 in diesen Zellsystemen nicht diesem von uns postulierten intramolekularen Hemmechanismus. Unterstützung für unsere Hypothese einer Interaktion von N- und C-Terminus von KIAA0337 lieferte folgendes *in vitro*-Experiment: Glutathion-Sepharose-"Beads", welche zuvor mit dem GST-Fusionsprotein des N-Terminus von KIAA0337, KIAA0337-ΔC, beladen worden waren, interagierten spezifisch mit dem C-Terminus von KIAA0337 ohne DH-Domäne, KIAA0337-ΔN2. Schließlich untersuchten wir den Effekt der Koexpression des N- und C-Terminus von KIAA0337 in HEK 293-Zellen auf die über SRF vermittelte Gentranskription. Aufgrund der fehlenden DH-Domäne war der C-Terminus KIAA0337-ΔN2 *per se* katalytisch inaktiv und hatte keinen Einfluß auf die Luciferase-Bildung. Die durch den N-Terminus KIAA0337-ΔC stimulierte Bildung des Reporters Luciferase wurde durch die Koexpression von KIAA0337-ΔN2 gehemmt. Dieses Ergebnis war somit ebenfalls in Übereinstimmung mit unserer Theorie einer Interaktion des N- und C-Terminus von KIAA0337. Bei der zusätzliche Expression des katalytisch inaktiven C-Terminus bindet dieser wahrscheinlich an den katalytisch aktiven N-Terminus mit der DH-Domäne, und es resultiert hieraus wieder wie beim Protein ganzer Länge von KIAA0337 eine intramolekulare Hemmung der katalytischen Aktivität.

Weitere Untersuchungen der SRF-vermittelten Gentranskription bezüglich der Beteiligung von KIAA0337 an der Aktivierung von Rho durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ergaben, daß die Koexpression von KIAA0337 auf die Rezeptor-Stimulationen

der Luciferase-Bildung durch LPA oder Carbachol keinen Einfluß hatte (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich unterliegt die Aktivität von KIAA0337 somit nicht der Regulation durch membranständige Rezeptoren und nachgeschaltete G-Proteine, sondern möglicherweise dem von uns postulierten intramolekularen Hemmechanismus. Wie zuvor bereits beschrieben, könnte die recht dominante Expression von KIAA0337 im Herzen auf eine spezifische Funktion in diesem Gewebe hindeuten. Die Funktion von KIAA0337 in intakten Zellen und seine physiologische Bedeutung bleiben allerdings noch weitgehend unklar. Da wir jedoch zeigen konnten, daß es sich bei KIAA0337 um einen Rho-spezifischen Austauschfaktor handelt, und da Rho an Signaltransduktionswegen beteiligt ist, die in Kardiomyocyten der Ratte zu hypertrophen Veränderungen führen (Sah *et al.*, 1996; Thorburn *et al.*, 1997; Aoki *et al.*, 1998; Hines *et al.*, 1998; Hoshijima *et al.*, 1998) und die Überexpression von RhoA im Herzen lebender Mäuse zu einer bradykarden Fehlregulation des Sinus- und Atrio-Ventrikular-Knotens mit nachfolgender tödlicher dilatativer Kardiomyopathie führt (Sah *et al.*, 1999), könnten Mutanten von KIAA0337, die wie die N- und C-terminal verkürzten Formen keiner intramolekularen Regulation mehr unterliegen, bei Erkrankungen des Herzens eine Rolle spielen. Gegen diese mögliche pathophysiologische Bedeutung spricht jedoch die Tatsache, daß dem chromosomalen Bereich, auf dem das Gen für KIAA0337 kartiert wurde, bislang keine menschliche Erkrankung zugeordnet werden konnte, die mit Herzabnormalitäten einhergeht, und daß keine signifikante Veränderung der Expression von KIAA0337 im gesunden im Vergleich zum geschädigten Herzen detektiert werden konnte (siehe oben). Auch im Fall Mono, das zu einer Untergruppe von Rho-GEFs zu gehört, die nur sehr eingeschränkt und vorwiegend im Gehirn exprimiert wird, scheint auf den ersten Blick kein Zusammenhang mit einer menschlichen Erkrankung zu existieren. Bislang wurde auf dem gesamten Chromosom 12, auf dem das Gen von Mono kartiert wurde, noch keine Region identifiziert, die mit einer entsprechenden menschlichen Erkrankung wie geistiger Behinderung in Verbindung gebracht werden konnte.

Zusammengefaßt stellen p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 drei neue, spezifische Austauschfaktoren für die GTPase Rho(A) dar, welche sehr verschiedene Expressionsmuster aufweisen und deren katalytische Aktivität durch unterschiedliche Signaltransduktionswege und molekulare Mechanismen reguliert wird. Während Mono sehr gewebespezifisch im Gehirn exprimiert wird und die Stimulation seiner katalytischen

Aktivität durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, vermutlich über $G\alpha_q$ vermittelt, über den C-Terminus erfolgt, konnte für das ubiquitär exprimierte p114-Rho-GEF keine klare Zuordnung zu den an der Stimulation dieses Rho-GEFs beteiligten G-Protein-Untereinheiten getroffen werden. Für das recht spezifisch im Herzen exprimierte KIAA0337, welches aufgrund seiner deutlich abweichenden Struktur den ersten Vertreter einer neuen Untergruppe der Dbl-Familie darstellen könnte, vermuten wir dagegen einen intramolekularen Hemmechanismus.

5. Zusammenfassung

Die Aktivierung kleiner GTPasen der Rho-Familie ist eine Antwort vieler Zellen auf die Stimulation membranständiger Rezeptoren und spielt bei zahlreichen zellulären Prozessen wie der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts und der Stimulation der Gentranskription eine bedeutende Rolle. Dabei sind die beteiligten Mechanismen bisher noch weitgehend unbekannt und scheinen für die diversen Rezeptoren und zellulären Systeme unterschiedlich zu sein. Der Aktivitätszustand der Rho-Proteine wird vermutlich vor allem durch die Interaktion mit entsprechenden Guaninnukleotid-Austauschfaktoren der Dbl-Familie (Rho-GEFs) positiv reguliert. Die bis heute bekannten Rho-GEFs bilden eine Familie von homologen Proteinen und zeigen zumindest hinsichtlich zweier Strukturmerkmale einen einheitlichen Aufbau, wenn sie auch ganz unterschiedliche molekulare Massen, Expressionsmuster und Spezifitäten für die verschiedenen Rho-GTPasen aufweisen. So besitzen alle bislang identifizierten Rho-GEFs ein Tandem aus katalytischer "Dbl homology" (DH)-Domäne und C-terminal benachbarter "Pleckstrin homology" (PH)-Domäne.

Mit p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 gelang die Identifizierung und Charakterisierung dreier neuer, für Rho(A) spezifischer GEFs unter Ausnutzung der Homologien zu den recht ähnlichen DH-Domänen der bekannten Rho-GEFs. Die cDNA von Mono wurde ausgehend von einem EST durch Homologie-Klonierungen aus einer humanen embryonalen Gehirn-cDNA-Bibliothek isoliert, während beim Durchsuchen von DNA- und Protein-Datenbanken die Sequenzen von p114-Rho-GEF und KIAA0337 interessant erschienen, deren cDNAs uns vom japanischen Kazusa-DNA-Forschungsinstitut zur Verfügung gestellt wurden.

Bei allen drei GEFs handelt es sich um vollständig klonierte Proteine mit unterschiedlichen Molekülmassen (p114-Rho-GEF, 114 kDa; Mono, 64 kDa; KIAA0337, 164 kDa). Untersuchungen der Sequenzen ergaben, daß sowohl p114-Rho-GEF als auch Mono das typische Strukturmotiv aus DH- und PH-Domäne besaßen, wohingegen KIAA0337 interessanterweise lediglich die DH-Domäne, jedoch nicht die PH-Domäne aufweist und daher möglicherweise den ersten Vertreter einer neuen Untergruppe der Dbl-Familie darstellt. Vergleiche der DH-Domänen der GEFs mit anderen DH-Domänen ließen bereits vermuten, daß es sich bei p114-Rho-GEF und Mono um Rho-spezifische Austauschfaktoren handeln könnte. Bei KIAA0337 war dagegen aufgrund der Sequenz keine Vorhersage über eine mögliche Aktivität und Spezifität gegenüber Rho-GTPasen möglich.

Northern Blot-Analysen der Expression von Mono und KIAA0337 in verschiedenen humanen Geweben zeigten, daß beide recht gewebespezifisch exprimiert werden, und zwar Mono recht spezifisch im Gehirn und KIAA0337 recht dominant im Herzen. Dagegen wird p114-Rho-GEF ubiquitär exprimiert. Mittels reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion konnten wir Transkripte für alle diese Faktoren in HEK293-Zellen und für KIAA0337 und p114-Rho-GEF in J82-Zellen nachweisen, die wir für unsere weiteren Untersuchungen verwendeten.

Die Guaninnukleotid-Austauschaktivität und die Spezifität gegenüber der GTPase

RhoA wurde für die drei neuen GEFs durch folgende Befunde belegt: Erstens, die aus dem Baculovirus/Sf9-System aufgereinigten Proteine von p114-Rho-GEF, Mono und KIAA0337 katalysierten deutlich den GDP/GTP-Austausch an RhoA, hatten jedoch keinen Einfluß auf Rac1 oder Cdc42. Zweitens, alle drei GEFs interagierten spezifisch mit RhoA, wobei KIAA0337 nur mit dem Nukleotid-freien Zustand, p114-Rho-GEF mit dem Nukleotid-freien und dem GTP γ S-gebundenen Zustand und Mono mit allen drei Nukleotid-gebundenen Zuständen von RhoA interagierte. Dagegen band keines der GEFs an Rac1 oder Cdc42 in allen untersuchten Zuständen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen *in vitro* führte die Überexpression von p114-Rho-GEF ebenso wie die Expression von Mono zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern in J82-Zellen, wie sie für aktiviertes RhoA typisch ist. Auch die Überexpression von KIAA0337 führte zur Ausbildung von Aktin-Streßfasern, wenn auch nur sehr schwach.

Schließlich untersuchten wir die Beteiligung der drei neuen Rho-GEFs an der Aktivierung von RhoA durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die für die Stimulation der GEF-Aktivität essentiellen Molekülteile durch Messung der über "Serum response factor" vermittelten Stimulation der Gentranskription in HEK293-Zellen. Die Überexpression von p114-Rho-GEF bzw. Mono stimulierte spezifisch über RhoA die SRF-vermittelte Gentranskription. Beide GEFs steigerten synergistisch die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induzierte Rho-abhängige Aktivierung der Gentranskription, während die Deletionsmutanten p114- Δ DH bzw. Mono- Δ DH die Effekte der Rezeptoren deutlich verringerten, was nahelegt, daß p114-Rho-GEF und Mono in Signaltransduktionswege von Rezeptoren zur Aktivierung von Rho eingeschaltet sind. Da die Koexpression von p114-Rho-GEF keinen potenzierenden Effekt auf die Stimulation der Gentranskription durch die untersuchten G-Protein-Untereinheiten ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$ RC, $G\beta_1\gamma_2$) hatte und die Koexpression von p114- Δ DH die Effekte jeder dieser Untereinheiten hemmte, war jedoch eine klare Bestimmung der an der Stimulation von p114-Rho-GEF beteiligten G-Protein-Untereinheiten nicht möglich. Untersuchungen der Expression verschiedener Deletionsmutanten von Mono führten zu der Vorstellung, daß Mono den Effekt von $G\alpha_q$ auf Rho vermitteln könnte und der C-Terminus von Mono für die Regulation seiner GEF-Aktivität eine wichtige Rolle spielt. Die Expression des Proteins ganzer Länge von KIAA0337 führte nicht zu einer Steigerung der Gentranskription. Dagegen wurde die Gentranskription durch Deletionsmutanten, denen entweder der N- oder C-Terminus fehlte, spezifisch über RhoA deutlich stimuliert. Dies legte nahe, daß KIAA0337 möglicherweise durch einen intramolekularen Hemmechanismus *per se* inaktiv gehalten wird, der auf der Interaktion von N- und C-Terminus beruhen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte *in vitro* eine Interaktion des N- und C-Terminus von KIAA0337 gezeigt werden, und die Koexpression der beiden Termini führte in zu einer Hemmung der bei der Expression jedes einzelnen Molekülteils beobachteten Stimulation der Gentranskription.

6. Literaturverzeichnis

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G. & Segal, A. W. (1991):
Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1.
Nature 353, 668-670.
- Adra, C. N., Manor, D., Ko, J. L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R. A. & Lim, B. (1997):
Rho-GDIgamma: A GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4279-4284.
- Aktories, K., Mohr, C. & Koch, G. (1992):
Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 175, 115-131.
- Alberts, A. S. & Treisman, R. (1998):
Activation of RhoA and SAPK/JNK signalling pathways by the RhoA-specific exchange factor mNET1. *EMBO J.* 14, 4075-4085.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. & Kaibuchi, K. (1996):
Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.
- Aoki, H., Izumo, S. & Sadoshima, J. (1998):
Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation. *Circ. Res.* 82, 666-676.
- Baldwin, J. M. (1994):
Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 180-190.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J. & Brown, A. M. (1990):
Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 163-224.
- Birnbaumer, L. (1992):
Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* 71, 1069-1072.
- Birnbaumer, L. & Birnbaumer, M. (1995):
Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *J. Rec. Sig. Transd. Res.* 15, 213-252.

- Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M., & Saraste, M. (1999):
The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* 24, 441-445.
- Boguski, M. S. & McCormick, F. (1993):
Proteins regulating ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. (1991):
The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.
- Bowman, E. J., Uhlinger, D. J. & Lambeth, J. D. (1993):
Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 268, 21509-21512.
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. & Sternweis, P. C. (1993):
ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144.
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N. & Johnson, G. L. (1995):
 $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631-24634.
- Casey, P. J. (1994):
Lipid modifications of G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 219-225.
- Cerione, R. A. & Zheng, Y. (1996):
The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 216-222.
- Chabre, M. & Deterre, P. (1989):
Molecular mechanisms of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* 179, 255-266.
- Chan, A., Takai, S., Yamada, K. & Miki, T. (1996):
Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. *Oncogene* 12, 1259-1266.
- Chang, J. H., Gill, S., Settleman, J. & Parsons, S. J. (1995):
c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* 130, 355-368.
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M. R., Rubin, E. J. & Gill, D. M. (1989):
The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* 8, 1087-1092.

- Chavrier, P. & Goud, B. (1999):
The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport: *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 466-475.
- Chihara, K., Amano, M., Nakamura, N., Yano, T., Shibata, M., Tokui, T., Ichikawa, H., Ikebe, R., Ikebe, M. & Kaibuchi, K. (1997):
Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 25121-25127.
- Chong, L. D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G. M. & Schwartz, M. A. (1994):
The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79, 507-513.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. & Burridge, K. (1996):
Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403-1415.
- Chuang, T. H., Xu, X., Knaus, U. G., Hart, M. J. & Bokoch, G. M. (1993):
GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 268, 775-778.
- Chuang, T. H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N. Groffen, J. & Bokoch, G. M. (1995):
Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10282-10286.
- Clapham, D. E. & Neer, E. J. (1993):
New roles for G-protein beta gamma dimers in transmembrane signalling. *Nature* 356, 403-406.
- Colomer, V., Engelender, S., Sharp, A. H., Duan, K., Cooper, J. K., Lanahan, A., Lyford, G., Worley, P. & Ross, C. A. (1997):
Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) binds to a Trio-like polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1519-1525.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J. S. (1995):
The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Coughlin, S. R. (1994):
Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: diversity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 191-197.

- Debant, A., Serra-Pages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S.-H. & Streuli, M. (1996):
The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5466-5471.
- De Toledo, M., Colombo, K., Nagase, T., Ohara, T., Fort, P. & Blangy, A. (2000):
The yeast exchange assay, a new complementary method to screen for Dbl-like protein specificity: identification of a novel RhoA exchange factor. *FEBS Lett.* 480, 287-292.
- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1991):
Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev. Biochem.* 60, 653-688.
- Donaldson, J. G. & Klausner, R. D. (1994):
ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 527-532.
- Eva, A. & Aaronson, S. A. (1985):
Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316, 273-275.
- Fleming, I. N., Elliott, C. M. & Exton, J. H. (1996):
Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 271, 33067-33073.
- Fromm, C., Coso, O. A., Montaner, S., Xu, N. & Gutkind, J. S. (1997):
The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and $G\alpha_{12}$ to the serum response element and to cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10098-10103.
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. & Gutkind, J. S. (1999):
A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* 274, 5868-5879.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. & Takai, Y. (1990):
Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 5, 1321-1328.

- Gebbink, M. F., Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F., Houssa, B. & Moolenaar, W. H. (1997):
Identification of a novel, putative Rho-specific GDP/GTP exchange factor and a RhoA-binding protein: control of neuronal morphology. *J. Biol. Chem.* 137, 1603-1613.
- Glaven, J. A., Whitehead, I. P., Nomanbhoy, T., Kay, R. & Cerione, R. A. (1996):
Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 27374-27381.
- Gohla, A., Harhammer, R. & Schultz, G. (1998):
The G-Protein G₁₃ but not G₁₂ mediates signaling from lysophosphatic acid receptor via epidermal growth factor to Rho. *J. Biol. Chem.* 273, 4653-4659.
- Gohla, A., Offermans, S., Wilkie, T. M. & Schultz, G. (1999):
Differential involvement of G₁₂ and G₁₃ in receptor-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.* 274, 17901-17907.
- Goldfarb, D. S. (1994):
GTPase cycle for nuclear transport. *Curr. Biol.* 4, 57-60.
- Hall, A. (1994):
A biochemical function for Ras - at last. *Science* 264, 1413-1414.
- Hall, A. (1998):
Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hancock, J. F. & Hall, A. (1993):
A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J.* 12, 1915-1921.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. & Fesik, S. W. (1994):
Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Hart, M. J., Maru, Y., Leonard, D., Witte, O. N., Evans, T. & Cerione, R. A. (1992):
A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science* 258, 812-815.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A. & Zheng, Y. (1994):
Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogenen product. *J. Biol. Chem.* 269, 62-65.
- Hart, M. J., Sharma, S., elMasry, N., Qiu, R.-G., McCabe, P., Polakis, P. & Bollag, G. (1996):
Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 270, 25452-25458.

- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. & Bollag, G. (1998):
Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G₁₃. *Science* 280, 2112-2114.
- Hartwig, J. H., Bokoch, G. M., Carpenter, C. L., Janmey, P. A., Taylor, L. A., Toker, A. & Stossel T. P. (1995):
Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82, 643-653.
- Hepler, J. R. & Gilman, A. G. (1992):
G-proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Hill, C. S. & Treisman, R. (1995):
Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J.* 14, 5037-5047.
- Hill, C. S., Wynne, J. & Treisman, R. (1995):
The Rho family GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42Hs regulate transcriptional activation of SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
- Hines, W. A. & Thorburn, A. (1998):
Ras and Rho are required for G α_q -induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 485-494.
- Hori, Y., Kikuchi, A., Isomura, M., Katayama, M., Miura, Y., Fujioka, H., Kaibuchi, K. & Takai, Y. (1991):
Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene* 6, 515-522.
- Horii, Y., Beeler, J. F., Sakaguchi, K., Tachibana, M. & Miki, T. (1994):
A novel oncogene, ost, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. *EMBO J.* 13, 4776-4786.
- Hoshijima, M., Sah, V. P., Wang, Y., Chien, K. R. & Brown, J. H. (1998):
The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes: involvement of Rho kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 7725-7730.
- Imamura, S. & Narumiya, S. (1993):
ADP-Ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G₁ phase of cell cycle. *Oncogene* 8, 1449-1455.

- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu A., et al. (1996):
The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15, 1885-1893.
- Jalink, K., Eichholtz, T., Postma, F. R., van Corven, E. J. & Moolenaar, W. H. (1993):
Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Diff.* 4, 247-255.
- Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sánchez, R., Ramón y Cajal, S., Wyllie, A. & Lacal, J. C. (1995):
Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* 10, 811-816.
- Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. & Van Aelst, L. (1996):
RAC regulation of actin polymerisation and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* 274, 1374-1376.
- Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M. R., Boquet, P., Hegenbarth, S. & von Eichel-Streiber, C. (1994):
Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* 269, 10706-10712.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. & Aktories, K. (1995):
Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375, 500-503.
- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G. A. & Aktories, K. (1996):
Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J. Biol. Chem.* 271, 10149-10153.
- Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A. & Negishi, M. (1998):
Constitutively active Gα12, Gα13, and Gαq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 28700-28707.
- Kins, S., Betz, H. & Kirsch, J. (2000):
Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat. Neurosci.* 3, 22-29.
- Keller, J., Schmidt, M., Hussein, B., Rümenapp, U. & Jakobs, K. H. (1997):
Muscarinic receptor-stimulated cytosol-membrane translocation of RhoA. *FEBS Lett.* 403, 299-302.
- Khosravi-Far, R., Soliski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S. & Der, C. J. (1995):
Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell Biol.* 15, 6443-6453.

- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu A. & Kaibuchi, K. (1996):
Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kjøller, L. & Hall, A. (1999):
Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell. Res.* 253, 166-179.
- Klages, B., Brabdt, U., Simon, M. I., Schultz, G. & Offermanns, S. (1999):
Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell. Biol.* 144, 745-754.
- Koch, J., Blomquist, A., Matena, M., Jakobs, K. H. and Rümenapp, U. (1999):
Characterisation of signal transduction pathways leading to cytoskeletal changes in human bladder carcinoma (J82) cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, R59.
- Kozak, M. (1991):
Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G. & Sternweis, P. C. (1998):
p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α_{12} and G α_{13} . *Science* 280, 2109-2111.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. & Lim, L. (1995):
The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1942-1952.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J. & Hall, A. (1996):
Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 87, 519-529.
- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M. & Schmid, S. L. (1996):
Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-179.
- Lancaster, C. A., Taylor-Harris, P. M., Self, A. J., Brill, S., van Erp, H. E. & Hall, A. (1994):
Characterisation of rho-GAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J. Biol. Chem.* 269, 1137-1142.

- Laudanna, C., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. (1996):
Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271, 981-983.
- Lelias, J. M., Adra, C. N., Wulf, G. M., Guillemot, J. C., Khagad, M., Caput, D. & Lim, B. (1993):
cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1479-1483.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B. & Schlessinger, J. (1995):
Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10472-10476.
- Leonard, D., Hart, M. J., Platko, J. V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T. & Cerione, R. A. (1992):
The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J. Biol. Chem.* 267, 22860-22868.
- Leung, T. Chen, X.-Q., Manser, E. & Lim, L. (1996):
The p160 RhoA-binding kinase ROK α is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5313-5327.
- Lim, L., Manser, E., Leung, T. & Hall, C. (1996):
Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphoinositide signalling pathways. *Eur. J. Biochem.* 242, 171-185.
- Mackay, D. J. G. & Hall, A. (1998):
RhoGTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 20685-20688.
- Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N. & Narumiya, S. (1995):
A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243-248.
- Majumdar, M., Seasholtz, T. M., Goldstein, D., de Lanerolle, P. & Brown, J. H. (1998):
Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin-stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 10099-10106.
- Majumdar, M., Seasholtz, T. M., Buckmaster, C., Toksoz, D. & Brown, J. H. (1999):
A rho exchange factor mediates thrombin and G α (12)-induced cytoskeletal responses. *J. Biol. Chem.* 274, 26815-26821.

- Malcolm, K. C., Ross, A. H., Qiu, R.-G., Symons, M. & Exton, J. H. (1994):
Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* 269, 25951-25954.
- Mao, J., Yuan, H., Xie, W. & Wu, D. (1998a):
Guanine nucleotide exchange factor GEF115 specifically mediates activation of Rho and serum response factor by the G protein α subunit G α 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12973-12976.
- Mao, J., Yuan, H., Xie, W., Simon, M. I. & Wu, D. (1998b):
Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 27118-27123.
- Mao, J., Xie, W., Yuan, H., Simon, M. I., Mano, H. & Wu, D. (1998c):
Tec/Bmx non-receptor tyrosine kinases are involved in regulation of Rho and serum response factor by G α 12/13. *EMBO J.* 17, 5638-5646.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., et al. (1996):
Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15, 2208-2216.
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam J. C., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. (1995):
A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature*, 375, 338-340.
- Miki, T., Smith, C. L., Long, J. E., Eva, A. & Fleming, T. P. (1993):
Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* 362, 462-465.
- Minden, E., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. & Karin, M. (1995):
Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
- Miura, Y., Kikuchi, A., Musha, T., Kuroda, S., Yaku, H., Sasaki, T. & Takai, Y. (1993):
Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 510-515.
- Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T. & Nakamura, T. (1994):
Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* 9, 1605-1612.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. & Lacal. J. C. (1997):
Multiple Signalling Pathways Lead to the Activation of the Nuclear Factor κ B by the Rho Family of GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 12779-12785.
- Morishita, R., Nakayama, H., Isobe, T., Matsuda, T., Hashimoto, Y., Okano, T., Fukada, Y.,

- Mizuno, K., Ohno, S., Kozawa, O., Kato, K. & Asano, T. (1995):
Primary structure of a γ subunit of G protein, γ_{12} , and its phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 29469-29475.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lütcke, A., Parton, R. G. & Zerial, M. (1996):
Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384, 427-432.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. & Saraste, M. (1993):
The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18, 343-348.
- Nagase, T., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. & Ohara, O. (1997):
Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 4, 141.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S., (1996):
ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 392, 189-193.
- Nobes, C. D. & Hall, A. (1995):
Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nobes, C. D., Hawkins, P., Stephens, L. & Hall, A. (1995):
Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J. Cell. Sci.* 108, 225-233.
- Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I. & Mizuno, K. (1995):
LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene* 11, 701-710.
- Okano, I., Hiraoka, J., Otera, H., Nunoue, K., Ohashi, K., Iwashita, S., Hirai, M. & Mizuno, K. (1995):
Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J. Biol. Chem.* 270, 31321-31330.
- Olofsson, B. (1999):
Rho Guanine Dissociation Inhibitors: Pivotal Molecules in Cellular Signalling. *Cell. Signal.* 11, 545-554.
- Olson, M. F., Ashworth, A. & Hall, A. (1995):

An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G₁. *Science* 269, 1270-1272.

- Olson, M. F., Pasteris, N. G., Gorski, J. L. & Hall, A. (1996):
Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr. Biol.* 6, 1628-1633.
- Olson, M. F., Sterpetti, P., Nagata, K., Toksoz, D. & Hall, A. (1997):
Distinct roles for DH and PH domains in the Lbc oncogene. *Oncogene* 15, 2827-2831.
- O'Toole, C. D., Price, Z. H., Ohnuku, Y. & Unsgaard, B. (1978):
Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 38, 64-76.
- Paterson, H. F., Self, A. J., Garrett, M. D., Just, I., Aktories, K. & Hall, A. (1990):
Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111, 1001-1007.
- Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Ramachandran, J. & Capon, D. J. (1988):
Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334, 434-437.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R. & Lacal, J. C: (1997):
Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, Cdc42, and Rac1 proteins. *Genes & Dev.* 11, 463-475.
- Plonk, S. G., Park, S. K. & Exton, J. H. (1998):
The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 4823-4826.
- Popoff, M. R., Chaves-Olarte, E., Lemichez, E., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., Chardin, P., Cussac, D., Antonny, B., Chavrier, P., Flatau, G., Giry, M., de Gunzburg, J. & Boquet, P. (1996):
Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J. Biol. Chem.* 271, 10217-10224.
- Qiu, R.-G., Chen, J., McCormick, F. & Symons, M. (1995a):
A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11781-11785.
- Qiu, R.-G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. & Symons, M. (1995b):
An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459.
- Quilliam, L. A., Khosravi-Far, R., Huff, S. Y. & Der C. J. (1995):

Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioassays* 17, 395-404.

Quilliam, L. A., Lambert, Q. T., Mickelson, Y. L., Westwick, J. K., Sparks, A. B., Kay, B. K., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G. & Der C. J. (1996):
Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling. *J. Biol. Chem.* 271, 28772-28776.

Ray, K., Kunsch, L., Bonner, L. M. & Robishaw, J. D. (1995):
Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein γ subunits, including three novel forms designated the γ_4 , γ_{10} and γ_{11} subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 21765-21771.

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. & Narumiya, S. (1996):
Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* 271, 13556-13560.

Reid, T., Bathoorn, A., Ahmadian, M. R. & Collard, J. G. (1999):
Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 274, 33587-33593.

Reif, K., Nobes, C. D., Thomas, G., Hall, A. & Cantrell, D. A. (1996):
Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr. Biol.* 6, 1445-1455.

Ren, X. D., Bokoch, G. M., Traynor, K. A., Jenkins, G. H., Anderson, R. A. & Schwartz M. A. (1996):
Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell* 7, 435-442.

Ren, Y., Li, R., Zheng, Y. & Busch, H. (1998):
Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 34954-34960.

Ridley, A. J. & Hall, A. (1992):
The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. (1992):
The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Ridley, A. J. & Hall, A. (1994):

Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J.* 13, 2600-2611.

Ridley, A. J. (1995):

Rac and Bcr regulate phagocytic phoxes. *Curr. Biol.* 5, 710-712.

Ron, D., Tronick, S. R., Aaronson, S. A. & Eva, A. (1988):

Molecular cloning and characterization of the human *dbl* proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells. *EMBO J.* 7, 2465-2473.

Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R. B., Hunt, L. T., Graziani, G., Tronick, S. R., Aaronson, S. A. & Eva, A. (1991):

A region of proto-*dbl* essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, *CDC24*, and the human breakpoint cluster gene, *bcr*. *Nem Biol.* 3, 372-379.

Roof, R. W., Haskell, M. D., Dukes, B. D., Sherman, N., Kinter, M. & Parsons, S. J. (1998):

Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7052-7063.

Ross, E. M. (1992) G-proteins and receptors in neuronal signaling.

In: Hall, Z. W. (Ed.): An introduction to molecular neurobiology, S. 181-206, New York: Sinauer Associates.

Rümenapp, U., Geiszt, M., Wahn, F., Schmidt, M. & Jakobs, K. H. (1995):

Evidence for ADP-ribosylation-factor-mediated activation of phospholipase D by m3 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 234, 240-244.

Rümenapp, U., Schmidt, M., Wahn, F., Tapp, E., Grannass, A. & Jakobs, K. H. (1997):

Characteristics of protein-kinase-C- and ADP-ribosylation-factor-stimulated phospholipase D activities in human embryonic kidney cells. *Eur. J. Biochem.* 248, 407-414.

Rümenapp, U., Schmidt, M., Olesch, S., Ott, S., Eichel-Streiber, C. V. & Jakobs, K. H. (1998a):

Tyrosine-phosphorylation-dependent and rho-protein-mediated control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *Biochem. J.* 334, 625-631.

Rümenapp, U., Vallböhrer, D., Herborn, C. & Jakobs, K. H. (1998b):

Calcium- and tyrosine kinase-dependent activation of RhoA by G protein-coupled receptors in human transitional-cell carcinoma (J82) cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, R59.

Rümenapp, U., Blomquist, A., Schwörer, G., Schablowski, H., Psoma, A. & Jakobs, K. H.

- (1999):
Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a Dbl family member. *FEBS Lett.* 459, 313-318.
- Rümenapp, U., Giesen, U., Blomquist, A., Moorkamp, C. Jakobs, K. H. and Wieland, T. (2000):
Involvement of different G proteins in the LPA-stimulated activation of Rho and serum response factor in human embryonic kidney 293 cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361, R52.
- Sah, V. P., Hoshijima, M., Chien, K. R. & Brown, J. H. (1996):
Rho is required for $G\alpha_q$ and α_1 -adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes: dissociation of Ras and Rho pathways. *J. Biol. Chem.* 271, 31185-31190.
- Sah, V. P., Minamisawa, S., Tam, S. T., Wu, T. H., Dorn, G. W., Ross, J., Chien, K. R. & Brown, J. H. (1999):
Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J. Clin. Invest.* 103, 1627-1634.
- Sahai E., Alberts, A. S. & Treisman R. (1998):
RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* 17, 1350-1361.
- Scherle, P., Behrens, T. & Staudt, L. M. (1993):
Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7568-7572.
- Schmidt, M., Rümenapp, U., Nehls, C., Ott, S., Keller, J., Von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K. H. (1996a):
Restoration of *Clostridium difficile* toxin-B-inhibited phospholipase D by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 240, 707-712.
- Schmidt, M., Rümenapp, U., Bienek, C., Keller, J., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K. H. (1996b):
Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 2422-2426.
- Seasholtz, T. M., Majumdar, M. & Brown, J. H. (1999):
Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling: *Mol. Pharmacol.* 55, 949-956.
- Sekimata, M., Kabuyama, Y., Emori, Y. & Homma, Y. (1999):
Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p12, a GTPase-activating protein for Rho. *J. Biol. Chem.* 274, 17757-17762.
- Shi, C. S., Sinnarajah, S., Cho, H., Kozasa, T. & Kehrl, J. H. (2000):

G13alpha-mediated PYK3 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha-induced serum response element-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 24470-24476.

Simon, M. I., Strathman, M. P. & Gautam, N. (1991):

Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.

Soh, J. W., Lee, E. H., Prywes, R. & Weinstein I. B. (1999):

Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1313-1324.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, D. & Treisman, R. (1999):

Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159-169.

Spiegel, A. M., Backlund, P. S., Butrynski, J. E., Jones, T. L. Z. & Simonds, W. F. (1991):

The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trens Biochem. Sci.* 16, 338-341.

Spiegel, A. M., Shenker, A. & Weinstein, L. S. (1992):

Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr. Rev.* 13, 536-565.

Stam, J.C. & Collard, J. G. (1999):

The DH Protein Family, exchange Factors for Rho-like GTPases. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 22, 51-83.

Sterpetti, P., Hack, A. A., Bashar, M. P., Park, B., Cheng, S., Knoll, J., Urano, T., Feig, L. A. & Toksoz, D. (1999):

Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting. *Mol. Cell Biol.* 19, 1334-1345.

Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt, C. P. & Finkel, T. (1996):

Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7115-7121.

Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T. (1999):

Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147, 1519-1532.

Sumi, T., Matsumoto, K. & Nakamura, T. (2001):

Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 670-676.

Suyama, M., Nagase, T. & Ohara, O. (1999):

- HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res.* 27, 338-339.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, F., McCormick, F., Francke, U. & Abo, A. (1996):
Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.
- Takai, Y., Sasaki, T., Tanaka, K. & Nakanishi, H. (1995):
Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 20, 227-231.
- Takaishi, K., Kikuchi, A., Kuroda, S., Kotani, K., Takuya, S. & Takai, Y. (1993):
Involvement of Rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (Rho GDI) in cell motility. *Mol. Cell. Biol.* 13, 72-79.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M. & Takai, Y. (1994):
Involvement of rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* 9, 273-279.
- Taylor, J. M., Hildebrand, J. D., Mack, C. P., Cox, M. E. & Parsons, J. T. (1998):
Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 8063-8070.
- Thorburn, J., Xu, S. & Thorburn, A. (1997):
MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *EMBO J.* 16, 1888-1900.
- Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebök, A., Marshall, F., Dyer, D. L. & Miledi, R. (1996):
Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: neurite-protective effects of cyclic AMP signaling. *J. Neurochem.* 66, 549-558.
- Toksoz, Y. & Williams, D. A. (1994):
Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. *Oncogene* 9, 621-628.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C. & Carpenter C. L. (1995):
Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 17656-17659.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J. A., Shaw, G., Lefkowitz, R. J. (1994):
Binding of G protein $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 269, 10217-10220.
- Treisman, R. (1990):

- The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin. Cancer Biol.* 1, 47-58.
- Treisman, R. (1994):
Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 96-101.
- Treisman, R. (1996):
Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.
- Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, Y. & Takai, Y (1990):
Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB, p20, a ras p21-like GTP-binding protein, *J. Biol. Chem.* 265, 9373-9380.
- Van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C. (1997):
Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
- Van Horck, F. P., Ahmadian, M. R., Haeusler, L. C., Moolenaar, W. H. & Kranenburg, O. (2001):
Characterization of p190RhoGEF: a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *J. Biol. Chem.* 276, 4948-4956.
- Vincent, S. & Settleman, J. (1997):
The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2247-2256.
- Wang, Y., Falasca, M., Schlessinger, J., Malstrom, S., Tsichlis, P., Settleman, J., Hu, W., Lim, B. & Prywes, R. (1998):
Activation of the c-fos serum response element by phosphatidyl inositol 3-kinase and rho pathways in HeLa cells. *Cell Growth Differ.* 9, 513-522.
- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. & Narumiya, S. (1996):
Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* 271, 645-648.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. & Narumiya, S. (1997):
p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16, 3044-3056.
- Watson, S. & Arkinstall, S. (Eds.) (1994):
The G-protein linked receptor facts book. Academic Press, London.
- Watson, J. A., Katz, A. & Simon, M. I. (1994):

- A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family: Expression in brain and activation of the $\beta 2$ isotype of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 269, 22150-22156.
- Watson, A. J., Aragay, A. M., Slepak, V. Z. & Simon, M. I. (1996):
A novel form of the G protein β subunit G $\beta 5$ is specifically expressed in the vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* 271, 28154-28160.
- Whitehead, I., Kirk, H., Tognon, C., Trigo-Gonzalez, G. & Kay, R. (1995a):
Expression cloning of lfc, a novel oncogene with structural similarities to guanine nucleotide exchange factors and to the regulatory region of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 18388-18395.
- Whitehead, I., Kirk, H. & Kay, R. (1995b):
Retroviral transduction and oncogenic selection of a cDNA encoding Dbs, a homolog of the Dbl guanine nucleotide exchange factor. *Oncogene* 10, 713-721.
- Whitehead, I. P., Khosravi-Far, R., Kirk, H., Trigo-Gonzalez, G., Der, C. J. & Kay, R. (1996):
Expression cloning of lsc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *J. Biol. Chem.* 271, 18643-18650.
- Whitehead, I., Campbell, S., Rossman, K. L. & Der, C. J. (1997):
Dbl family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, F1-F23.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S. & Narumiya, S. (1993):
ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* 8, 1449-1455.
- Yamane, H. K. & Fung, B. K. K. (1993):
Covalent modifications of G proteins. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 201-241.
- Yao, L., Kawakami, Y. & Kawakami, T. (1994):
The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9175-9179.
- Zeng, L., Sachdev, P., Yan, L., Chan, J. L., Trenkle, T., McClelland, M., Welsh, J. & Wang, L. H. (2000):
Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation. *Mol. Cell Biol.* 20, 9212-9224.
- Zerial, M. & Huber, L. A. (Eds.) (1995):
Guidebook to the small GTPases. Oxford University Press, Oxford.
- Zhang, J., King, W. G., Dillon, S., Hall, A., Feig, L. & Rittenhouse S. E. (1993):

Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* 268, 22251-22254.

Zheng, Y., Olson, M. F., Hall, A., Cerione, R. A. & Toksoz, D. (1995):
Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in Lbc oncogene function.
J. Biol. Chem. 270, 9031-9034.

Zheng, Y., Zangrilli, D., Cerione, R. A. & Eva, A. (1996a):
The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic Dbl through
specific intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 271, 19017-19020.

Zheng, Y., Fischer, D. J., Santos, M. F., Tigyi, G., Pasteris, N. G., Gorski, J. L. & Xu, Y.
(1996b):
The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific
guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271, 33169-33172.

Zigmond, S. H. (1996):
Signal transduction and actin filament organisation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 66-73.

Zigmond, S. H., Joyce, M., Borleis, J., Bokoch, G. M. & Devreotes, P. N. (1997):
Regulation of actin polymerization in cell-free systems by GTP γ S and Cdc42. *J. Cell Biol.* 138, 363-374.

7. Anhang

Während der Anfertigung der Promotion entstandene Publikationen:

Originalarbeiten:

Rümenapp, U., Blomquist, A., Schwörer, G., Schablowski, H., Psoma, A. & Jakobs, K. H. (1999):

Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a Dbp family member. FEBS Lett. 459, 313-318.

Blomquist, A., Schwörer, G., Schablowski, H., Psoma, A., Giesen, U., Lehnen, M., Jakobs, K. H. & Rümenapp, U. (2000):

Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. Biochem. J. 352, 319-325.

Abstracts von Postern/Vorträgen auf nationalen Tagungen:

Rümenapp, U., Blomquist, A., Schwörer, G., Telljohann, S. & Jakobs, K. H. (1999):

Involvement of different heterotrimeric G proteins and Rho GEFs in the LPA-stimulated formation of actin stress fibers. 40th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 1999. In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359, R58.

Koch, J., Blomquist, A., Matena, M., Jakobs, K. H. and Rümenapp, U. (1999):

Characterisation of signal transduction pathways leading to cytoskeletal changes in human bladder carcinoma (J82) cells. 40th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 1999. In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359, R59.

Rümenapp, U., Giesen, U., Blomquist, A., Moorkamp, C., Jakobs, K. H. & Wieland, T. (2000):

Involvement of different G proteins in the LPA-stimulated activation of Rho and serum response factor in human embryonic kidney 293 cells. 41th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2000. In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361, R52.

Blomquist, A., Schablowski, H., Schwörer, G., Jakobs, K. H. & Rümenapp, U. (2000):

Identification and characterisation of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. 41th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2000. In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361, R57.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Andrea Freichel-Blomquist
Abtskücher Str. 40, 42579 Heiligenhaus
Geburtsdatum: 05.04.1973
Geburtsort: Saarbrücken
Eltern Mutter: Ursula Blomquist, geb. Steinbach, Grundschullehrerin
Vater: Dr. Frithjof Blomquist, Diplom-Physiker

Schul- und Universitätsausbildung:

1979-1983: Besuch der Grundschule in Püttlingen
1983-1992: Besuch des Staatlichen Gymnasiums am Schloß in Saarbrücken
Abitur im Juni 1992
Oktober 1992 – Oktober 1996: Studium der Pharmazie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken
September 1994: 1. Staatsexamen
Oktober 1996: 2. Staatsexamen
Dezember 1997: 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
Januar 1998 – April 2001: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie der Universität GH Essen bei Prof. Dr. K. H. Jakobs
Anfertigung der Dissertation zur Promotion zum "Dr. rer. nat." mit dem Thema: "Klonierung und Charakterisierung neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für die GTPase Rho"

Praktika:

April 1993: Famulatur in der Rathaus-Apotheke, Püttlingen
April 1994: Famulatur in der Zentralapotheke der Bundesknappschaftsklinik, Püttlingen
Oktober 1996 – April 1997: Bären-Apotheke, Neuss
Mai 1997 – Oktober 1997: Entwicklungsanalytik, Bayer AG Leverkusen

Essen, den Andrea Freichel-Blomquist

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Klonierung und Charakterisierung neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für die GTPase Rho" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Andrea Freichel-Blomquist befürworte.

Essen,

(Prof. Dr. K. H. Jakobs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen,

(Andrea Freichel-Blomquist)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen,

(Andrea Freichel-Blomquist)

